

ФОСФОЛИПИДЫ И ХОЛЕСТЕРИН ЯДЕР ПЕЧЕНИ ПРИ ИСКУССТВЕННОМ ГИПОБИОЗЕ КРЫС

© 2017 г. И.К. Коломийцева, А.А. Лахина, Л.Н. Маркевич, Д.А. Игнатъев

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: ikolomizeva2@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.02.17 г.

После доработки 21.03.17 г.

Исследовано содержание липидов в ткани и ядрах клеток печени при искусственном гипобиозе крыс и липидов ядер клеток печени в течение трех суток после окончания охлаждения. В ядрах клеток печени при искусственном гипобиозе и в состоянии нормотермии через 24 ч после окончания охлаждения, количество общих фосфолипидов увеличено на 20% за счет минорных фосфолипидов. Количество сфингомиелина, фосфатидилинозитола, фосфатидилсерина, кардиолипина и лизофосфатидилхолина было увеличено в два раза при гипобиозе и в течение 72 ч немономонно возвращалось к норме. Количество жирных кислот, холестерина и диглицеридов возрастало на 30–40% в состоянии гипобиоза. Состояние искусственного гипобиоза не влияло на количество липидов в ткани печени крыс Wistar. Рост количества липидов в ядрах клеток печени крыс Wistar свидетельствуют о важной роли липидов в функциях ядра при угнетении энергообеспечения и синтеза белков в условиях искусственного гипобиоза.

Ключевые слова: крысы, искусственный гипобиоз, печень, ядра, липиды.

Исследование молекулярно-клеточных механизмов искусственного гипобиоза незимоспящих млекопитающих представляет интерес для функциональной биохимии, адаптационной медицины и при использовании гипотермии в медицинских целях [1–3]. Для введения мелких млекопитающих в состояние искусственного гипобиоза применяют различные способы, в том числе метод «закрытого сосуда» [4], когда за 3,5 ч пребывания в закрытом сосуде объемом 5 л в холодильной камере при 4°C температура тела снижается до 14–20°C. В условиях гипотермии/гипоксии/гиперкапнии, моделирующих условия норы зимоспящих, животное переходит в состояние «холодового наркоза» со снижением частоты сердечных сокращений до 50–70 уд/мин. Интенсивность метаболизма в этих условиях составляет 15% от нормы [5]. Возвращение крыс в нормотермию не сопровождается патологическими изменениями [5]. Искусственный гипобиоз, как и зимняя спячка млекопитающих, увеличивает устойчивость к действию разнообразных инфекций и ионизирующей радиации [1,2,5]. В ранних работах роль липидов в адаптации разнообразных организмов к низким температурам и в гибернации млекопитающих

рассматривали с точки зрения участия липидов в регуляции свойств клеточных мембран. Были обнаружены рост ненасыщенности жирных кислот фосфолипидов (за счет активации десатураз жирных кислот), падение количества холестерина и рост количества фосфатидилэтаноламина (ФЭА), способного образовывать гексагональные структуры. Все эти феномены способствуют снижению вязкости мембран [6,7]. Было установлено, что подготовка к сезону гибернации включает изменения свойств митохондриальных мембран [8], а холестерин и жирные кислоты улучшают показатели зимней спячки [9]. Роль липидов в системах внутриклеточной сигнализации обусловила интерес к изучению внутриклеточной локализации липидов при различных воздействиях на организм [10]. Было исследовано влияние зимней спячки (гибернации) на липиды органелл нейрональных клеток – микросомальной фракции и синапсом неокортекса якутского суслика *Spermophilus undulatus*. Результаты свидетельствовали о влиянии гибернации на липиды органелл и в общем соответствовали представлениям о снижении вязкости мембран при переходе животного в состояние оцепенения [11,12]. Однако при определении влияния гибернации якутского суслика на липидный состав ядер клеток печени были получены сведения о па-

Сокращения: ОФЛ – общая фракция липидов, ФЭА – фосфатидилэтаноламин, ЛФХ – лизофосфатидилхолин.

радоксально высоком содержании липидов у спящих животных [13]. Влияние искусственного гипобиоза на липидный обмен изучено гораздо меньше. Получены сведения о росте количества жирных кислот в плазме крови [1,7], изменениях метаболизма липидов тимуса [14] и росте количества холестерина и сфингомиелина ядер глии неокортекса крыс в состоянии искусственного гипобиоза [15]. В ходе зимней спячки состояние оцепенения якутского суслика *Spermophilus undulatus* протекает в условиях высокого содержания в ядрах клеток печени количества фосфолипидов, жирных кислот и холестерина по сравнению с летним периодом. Количество сфингомиелина и фосфатидилсерина растет в пять–шесть раз. При нормотермии в ходе гибернации (интербаут спячки) количество фосфолипидов и жирных кислот снижается, а количество холестерина остается повышенным [13]. Представляло интерес выяснить, как у млекопитающего, не располагающего системами фенотипической адаптации к гипобиозу, будет меняться количество липидов в ядрах клеток печени при гипобиозе и после выхода из него. Известно, что воздействие повреждающего агента на животный организм вызывает метаболический и функциональный ответ с участием центральной нервной системы [16,17]. При воздействии на организм различных агентов изменение величины метаболического ответа по ряду критериев – метаболизму белков, липидов, активности ферментов и др. – монотонно по времени после воздействия [18]. Этот феномен рассматривали как свидетельство включения прямых и обратных связей клеточного гомеостаза в метаболический ответ и в функциональные системы [19]. Мы поставили своей задачей исследование липидов ядер клеток печени крыс, находящихся в состоянии искусственного гипобиоза и в течение трех суток после окончания охлаждения для анализа динамики восстановления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили на самцах крыс линии *Wistar*, массой 200–230 г. Для охлаждения животных использовали метод «закрытого сосуда» [4]. Крыс декапитировали сразу после окончания охлаждения, через 24, 48 и 72 ч. Все процедуры с животными проводили в соответствии с требованиями институтской комиссии по этике и Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (European Communities Council Directive (86/609/EEC)).

Фракцию ядер клеток печени получали методом дифференциального центрифугирования по Шаво в модификации Уманского [20]. Чистоту получаемых ядер оценивали с помощью маркерных ферментов. Примесь митохондриальной фракции (по активности сукцинатдегидрогеназы) составляла до 1%, плазматической мембраны (по 5'-нуклеотидазе) – до 5%, эндоплазматического ретикулума (по глюкозо-6-фосфатазе) – до 15%. Аликвоты использовали для определения количества белка.

Липиды экстрагировали двадцатикратным объемом смеси хлороформ/метанол в соотношении 2 : 1 по объему и промывали по Фолчу [21]. Фосфолипиды разделяли методом тонкослойной хроматографии на силикагеле Н (60 × 0,2 мм, Merck, Германия), в системе метилацетат : *n*-пропанол : хлороформ : метанол : 0,25% KCl (25 : 25 : 25 : 10 : 9 по объему) [22]. Количество фосфолипидов определяли по неорганическому фосфору после сжигания [23]. Нейтральные липиды разделяли на силикагеле L (5/40) в системе гексан : этиловый эфир : уксусная кислота (73 : 25 : 2 по объему) [24] и определяли методом озоления по Маршу [25], холестерин определяли также по реакции с уксусным ангидридом [26]. Количество белка определяли по Лоури, количество липидов выражали в мкг липида на мг белка, при молекулярной массе фосфолипидов, равной 800 Да. Фосфолипидный состав оценивали в мольных процентах индивидуального фосфолипида от количества общих фосфолипидов.

Достоверность различий во всех опытах оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (TukeyTest).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Липиды ткани и ядер клеток печени крыс *Wistar*. Количество липидов в ядрах (в мкг липида на мг белка) существенно меньше, чем в ткани печени. В ядерной фракции печени количество общих фосфолипидов (ОФЛ) и жирных кислот на мг белка примерно в три раза, а холестерина – на 30% меньше, чем в ткани печени. Различия в количестве моно- и диглицеридов незначительны (табл. 1). Фосфолипидный состав ядер клеток печени близок к фосфолипидному составу гомогената. Массовыми фосфолипидами в гомогенате и ядрах являются фосфатидилхолин и ФЭА, третьим фосфолипидом выступает фосфатидилинозитол. Фосфолипидный состав ядер отличается от ткани печени в два раза меньшими долями ФЭА, фосфатидилсерина и кардиолипина. Ядра отличаются также наличием $3,5 \pm 0,7$ моль % лизофосфа-

Таблица 1. Количество липидов в ткани и ядрах клеток печени крыс *Wistar* (мкг липида/мг белка)

Липиды	Печень	Ядра клеток печени
Общие фосфолипиды	157 ± 3,2 (6)	43,6 ± 1,6 (7)
Сфингомиелин	9,0 ± 1,5 (6)	2,4 ± 0,4 (6)
Фосфатидилхолин	76,4 ± 1,6 (6)	27,0 ± 1,4 (6)
Фосфатидилсерин	8,0 ± 1,3 (4)	2,3 ± 0,4 (8)
Фосфатидилинозитол	16,5 ± 0,7 (6)	3,9 ± 0,6 (7)
Кардиолипин	10,9 ± 1,0 (6)	2,1 ± 0,2 (5)
Фосфатидилэтаноламин	39,1 ± 0,9 (6)	9,7 ± 0,7 (6)
Лизофосфатидилхолин	–	1,6 ± 0,2
Холестерин	12,1 ± 2,4 (6)	9,3 ± 1,0 (6)
Жирные кислоты	72,6 ± 10,5 (4)	20,0 ± 2,2 (5)
Моноглицериды	7,8 ± 1,1 (4)	14,7 ± 1,6 (5)
Диглицериды	7,8 ± 1,5 (4)	10,6 ± 1,0 (6)
Холестерин/ОФЛ, моль/моль	0,2 ± 0,02 (6)	0,4 ± 0,05 (6)

Примечание. В этой и последующих таблицах: (n) – количество экспериментов.

Таблица 2. Влияние искусственного гипобиоза на количество липидов в гомогенате печени крыс (мкг липида/мг белка)

Липиды	Контроль	Искусственный гипобиоз
Общие фосфолипиды	157 ± 3,2 (6)	162 ± 2,7 (5)
Сфингомиелин	9,0 ± 1,5 (6)	9,6 ± 1,4 (5)
Фосфатидилхолин	76,4 ± 1,6 (6)	80,2 ± 3,4 (5)
Фосфатидилсерин	8,0 ± 1,3(4)	11,6 ± 1,4 (4)
Фосфатидилинозитол	16,5 ± 0,7 (6)	17,9 ± 0,4(5)
Кардиолипин	10,9 ± 1,0 (6)	12,9 ± 0,3 (5)
Фосфатидилэтаноламин	39,1 ± 0,9 (6)	36,5 ± 1,6 (5)
Холестерин	12,1 ± 2,4 (6)	13,5 ± 2,1 (5)
Жирные кислоты	72,6 ± 10,5 (4)	73,2 ± 5,5 (5)
Моноглицериды	7,8 ± 1,1 (4)	7,85 ± 1,6 (5)
Диглицериды	7,8 ± 1,5 (4)	7,8 ± 2,0 (5)
Холестерин/ОФЛ, моль/моль	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,04
Белок, мг/г ткани	124,5 ± 12 (6)	107,3 ± 5,0 (5)

тидилхолина (ЛФХ). Соотношение холестерина/фосфолипиды в печени в два раза ниже, чем в ядерной фракции, составляя 0,2 и 0,4 соответственно (табл. 1).

Влияние искусственного гипобиоза на липиды ткани и ядер клеток печени. В гомогенате печени состояние искусственного гипобиоза не вызывало изменений количества липидов по отношению к белку (в мкг липида/мг белка) (табл. 2), однако в фосфолипидном составе обнаружилось изменения: мольная доля фосфати-

дилэтаноламина снизилась на 11% (табл. 3). В табл. 4 представлены данные о количестве липидов в ядрах клеток печени крыс в норме, в состоянии гипобиоза и через 24, 48 и 72 ч после окончания охлаждения. При искусственном гипобиозе и в нормотермии через 24 ч количество ОФЛ ядер было увеличено на 20% по сравнению с контролем, возвращаясь к норме через 48 и 72 ч после гипобиоза. Количество массовых фосфолипидов ядер – фосфатидилхолина и ФЭА – ни в состоянии гипобиоза, ни

Таблица 3. Влияние искусственного гипобиоза на фосфолипидный состав печени крыс *Wistar*, моль % фосфолипида от ОФЛ

Фосфолипиды печени	Контроль	Искусственный гипобиоз
Сфингомиелин	5,7 ± 0,9 (6)	5,9 ± 0,9 (5)
Фосфатидилхолин	48,6 ± 1,1 (6)	49,2 ± 1,3 (5)
Фосфатидилсерин	8,0 ± 3,0 (4)	7,1 ± 1,0 (4)
Фосфатидилинозитол	10,5 ± 0,5 (6)	11,0 ± 0,3 (5)
Кардиолипин	7,0 ± 0,6 (6)	7,9 ± 0,2 (5)
Фосфатидилэтанолламин	24,9 ± 0,6 (6)	22,4 ± 0,6* (5)

Примечание. В этой и в последующих таблицах: * – различие достоверно по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Таблица 4. Влияние искусственного гипобиоза и времени после воздействия на количество липидов в ядрах клеток печени крыс *Wistar* (мкг липида/мг белка)

Липиды	Контроль	Время после окончания охлаждения, часы			
		0	24 (5)	48 (4)	72 (4)
Общие фосфолипиды	43,6 ± 1,6 (7)	56,0 ± 2,0* (6)	56,3 ± 2,6*	46,0 ± 1,7	38,9 ± 3,3
Сфингомиелин	2,4 ± 0,4 (6)	6,1 ± 1,4* (4)	2,4 ± 0,2	1,1 ± 0,2*	1,0 ± 0,1*
Фосфатидилхолин	27,0 ± 1,4 (6)	28,9 ± 1,6 (4)	28,4 ± 1,1	28,0 ± 1,7	28,6 ± 1,1
Фосфатидилсерин	2,3 ± 0,4 (8)	6,0 ± 1,0* (6)	2,3 ± 0,4	1,6 ± 0,2	1,1 ± 0,2
Кардиолипин	2,1 ± 0,2 (5)	4,6 ± 1,3 (4)	1,8 ± 0,3	1,0 ± 0,1*	0,40 ± 0,09*
Фосфатидилэтанолламин	9,7 ± 0,7 (6)	9,7 ± 0,5 (4)	10,2 ± 1,3	9,5 ± 0,5	8,9 ± 0,9
Лизофосфатидилхолин	1,6 ± 0,2 (6)	5,3 ± 1,2* (5)	6,4 ± 0,4*	1,8 ± 0,3	–
Холестерин	9,3 ± 1,0 (6)	16,6 ± 2,0* (6)	9,1 ± 0,6	8,8 ± 2,4	7,6 ± 1,3
Жирные кислоты	20,0 ± 2,2 (5)	27,9 ± 1,7* (6)	28,1 ± 4,0	19,2 ± 0,7	21,1 ± 5,7
Моноглицериды	14,7 ± 1,6 (5)	16,6 ± 0,9 (6)	10,9 ± 3,7	10,1 ± 2,0	10,2 ± 1,9
Диглицериды	10,6 ± 1,0 (6)	17,2 ± 1,6* (6)	10,9 ± 1,8	8,5 ± 1,6	13,1 ± 1,9
ХЛ/ОФЛ, М/М	0,4 ± 0,05 (6)	0,5 ± 0,08 (6)	0,3 ± 0,03*	0,4 ± 0,05	0,4 ± 0,06
Белок, мг/г ткани	2,1 ± 0,4 (7)	1,8 ± 0,2 (6)	2,3 ± 0,2	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,2

в течение 72 ч после окончания охлаждения не изменялось. Изменения ОФЛ при искусственном гипобиозе определяли минорные фосфолипиды: количество сфингомиелина ядер у крыс в состоянии гипобиоза было увеличено в 2,5 раза по сравнению с нормой, к 24 ч возвращалось к контролю и через 48 и 72 ч снижалось до 50% от нормы. Количество фосфатидилсерина в ядрах крыс в состоянии гипобиоза возрастало почти в три раза, однако затем не отличалось от нормы. Количество кардиолипина обнаруживало уменьшение через 48 и 72 ч до 50% и 20% от нормы соответственно. Изменялось количество ЛФХ, в состоянии гипобиоза увеличиваясь в три раза, оставалось на этом уровне до 24 ч и снижалось до нормы к 48 ч. Через 72 ч количество ЛФХ оказалось за пределами чувствительности ме-

тода определения. Количество фосфатидилинозитола ядер в состоянии гипобиоза увеличивалось в три раза по сравнению с нормой, через 24 ч возвращалось к контрольным значениям, к 48 ч повышалось и снова возвращалось к норме через 72 ч после воздействия. Количество холестерина ядер клеток печени крыс при гипобиозе также возросло на 40%, возвратилось к норме через 24 и не менялось к 72 ч. Количество жирных кислот в ядрах крыс в состоянии гипобиоза возрастало на 30%, а далее не отличалось от нормы. Количество моноглицеридов не изменялось. Количество диглицеридов в ядрах крыс в состоянии гипобиоза возросло на 40%, возвратилось к норме через 24 ч после гипобиоза и далее не изменялось (табл. 4). Колебания фосфолипидного состава ядер повторяли закономерности, выявленные для со-

Таблица 5. Влияние искусственного гипобиоза на фосфолипидный состав ядер клеток печени крыс Wistar, моль % фосфолипида от ОФЛ

Липиды	Контроль	Время после окончания охлаждения, часы			
		0	24 (5)	48(4)	72(4)
Сфингомиелин	5,3 ± 0,8 (6)	11,3 ± 2,7* (4)	4,4 ± 0,5	2,3 ± 0,3*	2,6 ± 0,2*
Фосфатидилхолин	57 ± 3,5 (6)	52,7 ± 2,7 (4)	51,5 ± 4,9	66,4 ± 7,1	74,5 ± 6,0*
Фосфатидилсерин	4,8 ± 0,6 (6)	10,5 ± 1,6* (6)	4,2 ± 0,7	3,5 ± 0,3	2,7 ± 0,6*
Фосфатидилинозитол	8,5 ± 1,2 (6)	20,7 ± 3,2* (5)	7,7 ± 0,8	13,2 ± 1,6*	12,6 ± 1,4
Кардиолипин	4,5 ± 0,9 (6)	7,9 ± 2,2 (4)	3,4 ± 1,2	2,4 ± 0,5	0,7 ± 0,3*
Фосфатидилэтаноламин	19,4 ± 2,1 (6)	17,7±1,1 (4)	18,2 ± 2,1	21,9 ± 2,7	22,9 ± 1,5
Лизофосфатидилхолин	3,5 ± 0,7 (6)	11,0 ± 1,4* (5)	11,0 ±1,0*	3,9 ± 0,1	–

отношений фосфолипид/белок. Доля ФЭА ядер после гипобиоза не изменялась, а фосфатидилхолина – к 72 ч увеличивалась на 30% (табл. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сопоставляя количество липида на мг белка ткани и ядер, можно видеть, что ядра обеднены липидами (табл. 1), причем фосфолипидами в большей степени, чем холестерином. Наибольшим отличием фосфолипидного состава ядер является наличие ЛФХ. ЛФХ образуется за счет отщепления насыщенной жирной кислоты в положении 2 и за счет наличия ненасыщенной жирной кислоты является более активным метаболитом, чем фосфатидилхолин.

Основными фосфолипидами в норме в ядрах клеток печени и в ткани печени являются фосфатидилхолин и ФЭА, третий по количеству – фосфатидилинозитол. Фосфатидилинозитол в качестве третьего по количеству фосфолипида характерен и для ядер клеток печени якутского суслика [13], ядер клеток печени крыс [27], а также ядер нейронов и глии неокортекса, хотя в микросомальной фракции и в ткани неокортекса крыс третьим фосфолипидом является фосфатидилсерин [15].

Количество липидов в гомогенате печени крыс в состоянии искусственного гипобиоза не изменяется (табл. 2). Различия в ответе на искусственный гипобиоз липидов гомогената (табл. 2) и ядерной фракции (табл. 4) являются следствием распределения липидов в органеллах и в цитозоле гепатоцитов. Наибольшее количество белков и липидов гомогената печени – до 80% – содержится в 105000g-супернатантной и микросомальной фракциях [28]. Таким образом, липиды микросомальной фракции и 105000g-супернатантной фракции определяют характер влияния гипобиоза на липиды гомогената. Влияние искусственного гипобиоза на

липиды микросомальной фракции печени крыс крайне незначительно [29]. В ядрах клеток печени количество общих фосфолипидов, холестерина и жирных кислот увеличивается за время пребывания крысы в камере (3,5 ч) в условиях гипотермии/гипоксии/гиперкапнии. Этот эффект обусловлен нейроэндокринными механизмами с участием центральной нервной системы, нейромедиаторов, кортикоидов, катехоламинов, гормонов щитовидной железы и других факторов [1–3].

Степень увеличения количества индивидуальных липидов различна: количество холестерина и жирных кислот увеличивается в два раза, общих фосфолипидов – растет на 20%, основные фосфолипиды – фосфатидилхолин и ФЭА – не изменяются, а количество сфингомиелина, фосфатидилсерина и фосфатидилинозитола возрастает в два–три раза, обуславливая рост ОФЛ. Сфингомиелин участвует в регуляции пролиферации, воспаления, апоптоза [30,31]. Показано участие сфингомиелина микродоменов ядерной мембраны в заякоривании активного хроматина и транскрипционных факторов, ответственных за синтез ДНК и РНК [32]. Фосфатидилсерин активирует внутриядерные сигнальные белки, например, фосфатидилхолин-зависимую фосфолипазу С [31]. Гидролиз фосфатидилинозитолдифосфата с образованием инозитол-3-фосфата и диацилглицеролов включает многочисленные сигнальные пути клеточного метаболизма [10].

Количество диглицеридов в ядрах зависимо от активации ядерной фосфолипазы С и скорости выхода диглицеридов в цитоплазму [33]. Очевидно, что влияние искусственного и естественного гипобиоза затрагивает важные липидные компоненты ядер, участвующие в процессах регуляции клеточного деления, роста и апоптоза. Увеличение количества диглицеридов одновременно с ростом количества сфингомие-

лина, фосфатидилинозитола и фосфатидилсерина может рассматриваться как свидетельство участия сигнальных систем ядра в ходе погружения крыс в состояние гипобиоза. Однако феномен увеличения количества липидов в ядрах клеток печени при погружении в гипобиоз может рассматриваться и с других позиций.

Парадоксальный рост количества фосфолипидов в ядрах за счет минорных фосфолипидов одновременно с ростом количества холестерина и жирных кислот гепатоцитов никогда ранее не был выявлен ни при каких воздействиях, за исключением влияния гибернации на липиды ядер клеток печени якутского суслика [13,34]. Активация пролиферации гепатоцитов вызывала изменения количества липидов микродоменов ядерной мембраны, однако увеличение количества липидов ядер гепатоцитов не было отмечено [31]. Эффект гибернации на липиды ядер клеток печени якутских сусликов имеет отличия от эффекта искусственного гипобиоза в виде большого увеличения общих фосфолипидов, некоторого уменьшения количества мажорных фосфолипидов и более выраженного (пяти–шестикратного) роста сфингомиелина и фосфатидилсерина при отсутствии роста фосфатидилинозитола [13]. Однако прослеживается общий характер обогащения ядер клеток печени липидами при естественном и искусственном гипобиозе. При возвращении в нормотермию в ядрах клеток печени крыс нормализуется количество холестерина, жирных кислот и диглицеридов (табл. 4).

Возвращение в нормотермию гибернирующих якутских сусликов также сопровождается снижением количества жирных кислот, хотя количество холестерина остается на прежнем уровне [34]. Аналогия прослеживается и по снижению количества минорных фосфолипидов. Можно предположить, что сохранение ядерных функций в условиях почти стократно сниженного энергетического метаболизма осуществляется за счет минорных фосфолипидов и других липидов (жирных кислот, диглицеридов) в ядрах гепатоцитов спящих якутских сусликов. Накопление липидов в ядрах клеток печени спящих сусликов совпадает с торможением синтеза белков в печени при гибернации, которое наблюдали у зимоспящих одновременно с отсутствием индукции в печени белка-шаперона – индикатора стресса эндоплазматического ретикулаума. Накопление этого белка наблюдали в других органах, в частности, в буром жире и в головном мозге [35,36]. Искусственный гипобиоз крыс также сопровождается угнетением синтеза белка и отсутствием белка-шаперона в печени [37].

Таким образом, изменения количества липидов в ядрах клеток печени связаны со специфическим торможением в осуществлении ядерных функций. Они имеют сходный характер при искусственном и естественном гипобиозе млекопитающих. Динамика изменений количества липидов в ядрах клеток печени гибернантов практически не изучена, поскольку измерения проводились в одной временной точке – после пробуждения [13,34]. На ядрах клеток печени крыс *Wistar* показан специфический немонотонный вид изменений количества липидов в течение 72 ч после возвращения животного в нормотермию (табл. 4). Видно, что количество холестерина, жирных кислот и диглицеридов возвращается к норме через 24 ч после гипобиоза и далее не изменяются.

Гораздо более сложную картину представляют фосфолипиды. Отчетливо прослеживаются специфические немонотонные изменения количества фосфолипидов по времени после гипобиоза. Немонотонность можно рассматривать как свидетельство участия систем клеточного гомеостаза в нормализации количества ядерных липидов [19]. Возможно, что продукты метаболизма ядерных липидов осуществляют регуляторные воздействия, реализуемые в виде немонотонных изменений количества фосфолипидов, предшествующее нормализации. Метаболизм сфингомиелина ядер представляет картину связей и взаимозависимостей, способных оказывать регуляторные воздействия [38]. Изменения фосфолипидного состава ядер клеток печени крыс *Wistar* могут быть использованы для выяснения роли минорных фосфолипидов в восстановлении ядерных функций, в частности в регуляции синтеза белков. Видно, что состояние искусственного гипобиоза совпадает с заменой ФЭА на фосфатидилинозитол в качестве массового фосфолипида. Через 24 ч ЛФХ занимает место третьего компонента вместо фосфатидилинозитола. Через 48 и 72 ч фосфолипидный состав возвращается к контролю, но количество ЛФХ снижается до неопределяемых количеств (табл. 5).

Представляют большой интерес исследования нейроэндокринных влияний на метаболизм липидов при искусственном и естественном гипобиозе млекопитающих. При гибернации млекопитающих уровень тиреоидных гормонов и тестостерона в крови в январе–феврале резко повышен [39]. Функции надпочечников по критериям количества оксистероидов С-17, норадrenalина и адреналина подавлены [40]. Тригидтиронин при длительном введении вызывает снижение количества фосфатидилинозитола в три раза и увеличение кардиолипина в ядерной

фракции печени и в ткани печени крыс [41]. Введение гидрокортизона вызывает рост количества липидов в ядерном матриксе гепатоцитов крыс, более всего увеличивается количество сфингомиелина [42]. Вход в состояние искусственного гипобиоза активирует нейроэндокринную систему млекопитающего с выбросом нейромедиаторов и гормонов [1]. Исследования динамики липидов в ядрах клеток печени при искусственном гипобиозе и выходе из него в сопоставлении с ролью нейроэндокринных факторов и метаболитов индивидуальных липидов представляются плодотворными для понимания роли ядерных липидов тканей млекопитающих при воздействии низких температур окружающей среды.

ВЫВОДЫ

Обнаружено повышенное содержание липидов в ядрах клеток печени при искусственном гипобиозе крыс *Wistar*. Рост количества минорных фосфолипидов, холестерина и жирных кислот ядер с одновременным торможением синтеза белков и отсутствием появления белка – шаперона в печени зимоспящих и незимоспящих млекопитающих в состоянии гипобиоза имеют сходный характер. По-видимому, этот ответ на воздействие гипотермии в условиях гипоксии/гиперкапнии фенотипически обусловлен. Искусственный гипобиоз, в отличие от гипбернации, в меньшей степени влияет на количество фосфолипидов и нейтральных липидов ядер клеток печени. Рост количества липидов в ядрах клеток печени млекопитающих в условиях гипотермии/гипоксии/гиперкапнии играет регуляторную и, возможно, защитную роль.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Н. Н. Тимофеев, *Гипобиоз и криобиоз. Прошлое, настоящее и будущее* (Знание, М., 2005).
2. Е. В. Майстрах, *Гипотермия и анабиоз* (Наука, М., 1964).
3. Ф. З. Меерсон и М. Г. Пшенникова, *Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам* (Медицина, М., 1988).
4. Д. А. Игнатъев, Л. А. Фиалковская, Н. И. Перепелкина и др., *Радиац. биология. Радиоэкология* **46**, 705 (2006).
5. I. K. Kolomyitseva, L. N. Markevich, N. I. Perepelkina, et al., in *Hypothermia: prevention, recognition and treatment*, Ed. by J. I. V. Delgado and V. G. F. Garza (Nova Sci. Publ., N.Y., 2012), pp. 1–42.
6. J. Dark, *Annu. Rev. Nutr.* **25**, 469 (2005).
7. Л. П. Смирнов и В. В. Богдан, *Липиды в физиолого-биохимических адаптациях экотермных организмов*

к абиотическим и биотическим факторам среды (Наука, М., 2007).

8. D. J. Pehowich, P. M. Macdonald, R. N. McElhaney, et al., *Biochemistry* **27**, 4632 (1988).
9. T. Ruf and W. Arnold, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **294**, 1044 (2008).
10. M. E. Berridge, *Physiol. Rev.* **96**, 1261 (2016).
11. И. К. Коломийцева, Н. И. Перепелкина, И. В. Патрушев и В. И. Попов, *Биохимия* **68** (7), 954 (2003).
12. I. K. Kolomyitseva, N. I. Perepelkina, A. D. Zharikova, and V. I. Popov, *Comp. Biochem. Physiol. B* **151**, 386 (2008).
13. А. А. Лахина, Л. Н. Маркевич, Н. М. Захарова и др., *Докл. РАН* **469** (1), 108 (2016).
14. О. В. Быкова, Л. Н. Маркевич и И. К. Коломийцева, *Вестник ННГУ. Сер. Биология* **1** (1), 100 (2012).
15. И. К. Коломийцева, Л. Н. Маркевич, Д. А. Игнатъев и О. В. Быкова, *Биохимия* **75** (9), 1265 (2010).
16. Б. С. Доброборский, *Термодинамика биологических систем* (СПб., 2006).
17. П. К. Анохин, *Кибернетика функциональных систем* (Медицина, М., 1998).
18. I. K. Kolomyitseva, L. V. Slozhenikina, L. A. Fialkovskaya, et al., *J. Biol. Phys.* **25**, 325 (1999).
19. И. К. Коломийцева, *Биофизика* **54** (5), 946 (2009).
20. С. Р. Уманский и Ю. И. Ковалев, *Биоорг. химия* **1**, 463 (1975).
21. J. Folch, M. Lees, and G. H. Sloane-Stanley, *J. Biol. Chem.* **226**, 497 (1957).
22. F. Vitiello and J. B. Zanetta, *J. Chromatography* **166**, 637 (1978).
23. I. Gerlach and B. Deuticke, *Biochem. Zeitschrift* **337**, 477 (1963).
24. М. И. Прохорова и З. Н. Тупикова, *Большой практикум по углеводному и липидному обмену* (Изд-во ЛГУ, Л., 1965).
25. J. B. Marsh and D. B. Weinstein, *J. Lipid Res.* **7**, 574 (1966).
26. W. H. Sperry and M. Webb, *J. Biol. Chem.* **187**, 97 (1950).
27. I. K. Kolomyitseva, T. P. Kulagina, L. N. Markevich, et al., *Bioelectrochemistry* **58** (1), 31 (2002).
28. C. L. Iesema and D. J. Morre, *J. Biol. Chem.* **253** (21), 7960 (1978).
29. S. Melnychuk, V. Morozova, and L. Stepanova, *Int. Sci. Electr. J. Earth BioResources and Quality of Life* **4** (2013).
30. A. V. Alessenko and E. B. Burlakova, *Bioelectrochemistry* **58**, 13 (2002).
31. E. Albi and M. P. Viola Magni, *Biology of the Cell* **96**, 657 (2004).
32. E. Albi, A. Lazzarini, R. Lazzarini, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 6529 (2013).
33. S. Carraso and I. Merida, *Biochem. Sci.* **32** (1), 27 (2007).
34. И. К. Коломийцева, А. А. Лахина, Л. Н. Маркевич и Е. Е. Фесенко, *Докл. РАН* **470** (5), 599 (2016).

35. L. E. Epperson, T. A. Dahl, and S. L. Martin, *Mol. Cell. Proteomics* **3**, 920 (2004).
36. H. Mamady and K. B. Storey, *Mol. Cell. Biochem.* **292** (1–2), 89 (2006).
37. T. Oda, K. Shimizu, A. Yamaguchi, et al., *Cryobiology* **65** (2), 104 (2012).
38. A. V. Alessenko, *Membr. Cell. Biol.* **13** (2), 303 (2000).
39. M. Laplaud, M. Saboureau, L. Beaubatie, and E. I. Bachir-Omari, *Biochim. Biophys. Acta* **1005**, 143 (1989).
40. G. M. Wenberg and J. C. Holland, *Comp. Biochem. Physiol. A. Comp. Physiol.* **44** (3), 775 (1973).
41. R. Bucki, M. Gyrska, M. Zendzian-Piotrowska, and J. Gyrski, *J. Physiol. Pharmacol.* **51** (3), 535 (2000).
42. Э. С. Геворкян, Ж. В. Явроян и Г. А. Паносян, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **194** (8), 171 (1987).

Phospholipids and Cholesterol of the Liver Nuclei during Artificial Hypobiosis of Rats

I.K. Kolomyitseva, A.A. Lakhina, L.N. Markevich, and D.A. Ignat'ev

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Lipid content of tissue and nuclei of liver were studied during artificial hypobiosis of rats and liver nuclei lipids were monitored for three days after cooling. During artificial hypobiosis, and in the state of normothermia, 24 hours after the end of cooling, total phospholipids content of liver nuclei increased by 20% by virtue of minor phospholipids. The amounts of sphingomyelin, phosphatidylinositol, phosphatidylserine, cardiolipin and lysophosphatidylcholine were doubled during hypobiosis and then returned nonmonotonously to the normal level within 72 hours. In the state of artificial hypobiosis, the amount of fatty acids, cholesterol and diglycerides increased by 30–40%. The state of artificial hypobiosis did not affect the amount of lipids in the liver tissue of Wistar rats. An increase of the lipid content in the liver nuclei of Wistar rats points to the important role of lipids in functions of the nucleus when energy supply and protein synthesis are inhibited under conditions of artificial hypobiosis.

Key words: rats, artificial hypobiosis, liver, nuclei, lipids