

ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРОВ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА СФИНГОЛИПИДОВ НА ИНСУЛИН-ИНДУЦИРОВАННОЕ ПОГЛОЩЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ И СИНТЕЗ ГЛИКОГЕНА В КЛЕТКАХ ПЕЧЕНИ СТАРЫХ КРЫС

© 2015 Н.А. Бабенко*, В.С. Харченко

Харьковский национальный университет
им. В.Н. Каразина, НИИ биологии, 61022 Харьков,
пл. Свободы, 4, Украина; факс: +38(057)335-2923,
электронная почта: babenko@univer.kharkov.ua

Поступила в редакцию 06.06.14

После доработки 06.08.14

Сфинголипиды играют важную роль в развитии резистентности клеток-мишеней к действию инсулина. Наиболее активными ингибиторами сигнальной трансдукции инсулина являются церамиды, уровень которых существенно повышается в клетках под действием стресса и в процессе старения. В настоящей работе изучена роль различных звеньев метаболизма сфинголипидов в развитии инсулинорезистентности клеток печени в старости. Ингибирование одного из ключевых ферментов синтеза (серинпальмитоилтрансферазы или церамидсинтазы) или деградации сфинголипидов (кислой или нейтральной сфингомиелиназы – СФМазы) с помощью специфических ингибиторов (мириоцина, фумонизина В1, имипрамина и GW4869) сопровождалось снижением содержания церамида и частичным улучшением ответа клеток на действие инсулина в гепатоцитах старых животных. Имипрамин и GW4869 снижали активность кислой и нейтральной СФМазы соответственно в клетках печени старых крыс. Синтез церамида и СФМ снижался при действии мириоцина или фумонизина В1 в «старых» гепатоцитах. При совместном действии ингибиторов происходило восстановление содержания церамида и СФМ и регуляции инсулином метаболизма глюкозы в инсулин-резистентных клетках. Полученные данные свидетельствуют о важной роли как вновь синтезированных церамида и СФМ, так и церамида, образующегося в результате деградации СФМ, в развитии резистентности гепатоцитов к действию инсулина в старости.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гепатоциты, инсулинорезистентность, старение, мириоцин, фумонизин В1, имипрамин, GW4869.

Сфинголипиды представляют собой класс биологически активных молекул, вовлеченных в регуляцию физиологических процессов, таких как рост клеток, апоптоз, аутофагия, ангиогенез, воспаление и нейродегенерация. Сфинголипиды играют важную роль в развитии резистентности клеток-мишеней к действию инсулина. Модуляция содержания сфинголипидов в тканях-мишенях действия инсулина в условиях *in vivo* и в экспериментах на культивируемых клетках, как правило, сопровождается измене-

нием их чувствительности к действию гормона. Наиболее активными ингибиторами различных звеньев сигнальной трансдукции инсулина являются церамиды и ганглиозиды. Инсулинорезистентность, индуцированная высококалорийной диетой или инфузией липидов, сопровождается накоплением в мышечной ткани и печени не только предшественника синтеза сфинголипидов *de novo* – пальмитиновой кислоты, но и церамида [1, 2], в то время как ингибиторы ключевого фермента синтеза сфинголипидов (СПТ) – мириоцин и циклосерин – препятствуют накоплению церамида и нормализуют гомеостаз глюкозы в организме. С помощью легко проникающих в клетки аналогов церамида показано, что в мышечной ткани церамиды ингибируют важное звено сигналинга инсулина, а именно протеинкиназу Akt/PKB (EC 2.7.11.1) посредством подавления транслокации фермента в плазматические мембраны и/или дефосфорилирования

Принятые сокращения: СФМ – сфингомиелин, СФМазы – сфингомиелиназа, GW4869 – специфический неконкурентный ингибитор нейтральной СФМазы, СПТ – серинпальмитоил-СоА-трансфераза, ФЛД – фосфолипаза D, Akt/PKB – протеинкиназа B, mTOR – мишень рапамицина у млекопитающих, GLUT – транспортер глюкозы, ФНО- α – фактор некроза опухоли альфа, ИЛ – интерлейкин.

* Адресат для корреспонденции.

протеинкиназы под действием протеинфосфатазы P2 (ЕС 3.1.3.16), являющейся мишенью церамида в различных клетках [3, 4]. Установлена важная роль церамидов в нарушении ФЛД-зависимого сигналинга инсулина в клетках печени старых крыс [5]. Подавление синтеза сфинголипидов *de novo* с помощью мириоцина нивелирует возрастное нарушение регуляции инсулином активности ФЛД (ЕС 3.1.4.4), но не восстанавливает до уровня молодых животных уровень церамидов и индукцию обмена глюкозы инсулином в клетках печени старых крыс [5].

Экзогенные ганглиозиды GM3 ингибируют фосфорилирование тирозина инсулинового рецептора и субстрата 1 инсулинового рецептора (IRS-1) в адипоцитах 3T3 L1 [6]. Различные ингибиторы синтеза глюкозилцерамидов [7, 8], так же как и нокаут ферментов [9] в клетках мышечной ткани и печени, усиливают стимуляцию инсулином фосфорилирования инсулинового рецептора, протеинкиназы Akt/PKB и mTOR. В то же время нарушение синтеза и снижение содержания СФМ, но не ганглиозидов GM3 в печени, мышечной и жировой тканях и плазматических мембранах клеток печени мышей, характеризующихся дефицитом СФМсинтазы 2 (ЕС 2.7.8.27) или 2-й субъединицы СПТ (ЕС 2.3.1.50), является важной причиной увеличения чувствительности тканей к действию инсулина [10]. Важным представляется то, что содержание церамида повышается в печени и мышечной ткани, не изменяется в плазматических мембранах клеток печени СФМсинтаза-дефицитных животных и существенно снижается в мембранах СПТ нокаутных мышей. Учитывая эти данные и результаты других исследований [11, 12], можно предположить, что церамиды и ганглиозиды не являются единственными медиаторами в развитии инсулинорезистентности в тканях-мишенях.

Повышение содержания СФМ в плазматических мембранах адипоцитов и эритроцитов предшествует развитию резистентности к действию инсулина и гиперинсулемии у пациентов с ожирением [13]. Дефицит СФМсинтазы 2 и нарушение синтеза СФМ у нокаутных животных предотвращают индукцию под действием высокожировой диеты ожирения и инсулинорезистентности [14]. Подавление экспрессии СФМсинтазы с помощью siRNA также снижает в клетках HepG2 содержание больших липидных капель и триацилглицерина в печени лептин-дефицитных мышей *ob/ob*. СФМсинтаза 2 локализована в липидных микродоменах и частично ассоциирована с транспортером жирных кислот – CD36/FAT и кавеолоном 1. Поскольку СФМсинтаза 2 модулирует содержание СФМ в липидных платформах, авторы приходят к зак-

лючению, что именно конформационные изменения мембран опосредуют участие фермента в регуляции процесса ожирения и диабета 2 типа. Учитывая то, что СФМ является компонентом липидных рафтов, играющих важную роль в компартиментализации инсулинового сигналинга, можно полагать, что изменение содержания СФМ и упорядоченности липидного бислоя плазматических мембран является важной причиной нарушения сигнальной трансдукции инсулина.

В настоящее время остаются нерешенными вопросы, какие именно сфинголипиды и нарушение каких звеньев метаболизма сфинголипидов играют ключевую роль в развитии инсулинорезистентности в клетках печени в старости. Ввиду этого целью настоящей работы явилось изучение действия специфических ингибиторов ферментов синтеза и деградации СФМ и церамида на способность старых клеток печени адекватно отвечать на действие инсулина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на молодых (3-месячных) и старых (24-месячных) крысах-самцах линии Вистар. Гепатоциты выделяли по методу Петренко с соавт. [15]. Нативность клеток оценивали с помощью трипанового синего. Выживаемость клеток составила 90–96%. Свежевыделенные гепатоциты ресуспендировали в среде Игла (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Россия), содержащей 10%-ную эмбриональную сыворотку (ООО «БиолоТ», Россия), 20 мМ Нерес, пенициллин (61 мг/л), стрептомицин (100 мг/л), до $4 \cdot 10^7$ клеток/мл, и инкубировали в течение 3 ч при 37°. После инкубации гепатоциты отмывали буфером Кребс–Хенселейт с 0,1% БСА («Sigma», США) и разводили перед началом эксперимента в том же буфере. Для ингибирования синтеза церамида *de novo* гепатоциты 24-месячных крыс инкубировали в течение 2 ч при 37° в присутствии 5 мкМ мириоцина или 1 мкМ фумонизина В1 («Sigma», США). Синтез церамидов изучали в присутствии [14 C]пальмитиновой кислоты (1 мкКи/мл, 56 мКи/мМ, «Amersham», «GE Health Care», Великобритания). Для ингибирования кислой и нейтральной СФМзы гепатоциты 24-месячных крыс инкубировали в течение 2 ч при 37° в присутствии 50 мкМ имипрамина («Sigma», США) или 5 мкМ GW4869 («Sigma-Aldrich», Германия) соответственно. В отдельных случаях клетки инкубировали в присутствии ингибиторов как синтеза, так и деградации сфинголипидов.

Для определения активности СФМаз (ЕС 3.1.4.12) гепатоциты лизировали в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 1 мМ ЭДТА, 10 мМ MgCl₂, 0,65%-ного тритона X-100 (для последующего определения активности нейтральной СФМазы), или в буфере, содержащем 50 мМ CH₃COONa (pH 5,0), 0,65%-ного тритона X-100 (для последующего определения активности кислой СФМазы). Реакционная смесь содержала 1,5 мг белка и 0,74 нмоль СФМ [метил-¹⁴C-холлин]сфингомиелина (52 мКи/мМ, «PerkinElmer», США) в конечном объеме 200 мкл. Пробы инкубировали в течение 1 ч, реакцию останавливали добавлением 1,5 мл смеси CHCl₃ : CH₃OH (1 : 2 v/v) с последующим добавлением 1 мл CHCl₃ и 1 мл H₂O. Смесь центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об/мин. После разделения фаз алиquotы верхней и нижней фаз, содержавшие [¹⁴C]фосфорилхолин и [¹⁴C]СФМ соответственно, использовали для определения радиоактивности. Активность фермента выражали в нмолях продукта или субстрата на 1 мг белка за 1 ч.

Немеченые ¹⁴C-гепатоциты использовали для изучения индуцированного инсулином (инсулин свиной монокомпонентный, «Индар», Украина) поглощения 2-D-[³H]-глюкозы (0,5 мКи/мл) и включения D-[U¹⁴C]-глюкозы (0,1 мКи/мл) в гликоген по методу, описаному Брутман-Баразани с соавт. [16]. Гепатоциты предварительно инкубировали в присутствии ингибиторов обмена сфинголипидов или без них в течение 2 ч. Затем отмывали от добавок буфером HBS (HEPES-buffered saline), содержащим 20 мМ HEPES, и инкубировали в том же буфере в течение 30 мин в присутствии 10 нМ инсулина (или 0,9%-ным NaCl в качестве контроля к инсулину), затем отмывали буфером HBS, разводили в нем же, добавляли 0,5 мКи/мл 2-D-[³H]-глюкозы и инкубировали еще 10 мин при 37°. Для определения синтеза гликогена клетки отмывали от добавок буфером HBS и инкубировали в буфере HBS с 5 мМ глюкозой, отдельно вносили 10 нМ инсулин (или 0,9%-ным NaCl в качестве контроля к инсулину) и 0,1 мКи/мл D-[U¹⁴C]-глюкозу, гепатоциты инкубировали 2 ч при 37°. Реакцию останавливали ледяным 0,9%-ным NaCl и отмывали тем же раствором 3 раза. Клетки лизировали 50 мМ NaOH. Радиоактивность меченых [³H]глюкозы и [¹⁴C]гликогена определяли с помощью счетчика радиоактивности БЕТА.

Экстракцию липидов проводили по методу Блай и Дайер [17]. Разделение отдельных липидов проводили методом ТСХ на пластинках Sorbfil (АО «Сорбполимер», Россия) в системах растворителей: CH₃CH₂OCH₂CH₃ (система 1) и CHCl₃ : CH₃OH : H₂O (40 : 10 : 1 v/v/v) (система 2). Пятна липидов проявляли в парах йода и иден-

тифицировали, сравнивая со стандартами. Радиоактивность ¹⁴C-липидов определяли с помощью счетчика радиоактивности БЕТА. Данные представлены в виде: среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Для сравнения двух групп использовали *t*-критерий Стьюдента; для сравнения данных, полученных в результате множественного воздействия, использовали многофакторный дисперсионный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Установлено, что в клетках печени крыс в старости существенно повышался уровень вновь синтезированного в присутствии [¹⁴C]пальмитиновой кислоты церамида и СФМ (рис. 1).

С целью выяснения возможного механизма возрастных изменений в содержании церамида и СФМ в клетках печени изучали действие ингибиторов синтеза и деградации сфинголипидов на гепатоциты старых крыс. Применяемые в работе ингибиторы обмена сфинголипидов не оказывали существенного влияния на жизнеспособность клеток печени (рис. 2) и вызывали значительные изменения в содержании СФМ и церамида в гепатоцитах старых 24-месячных крыс. Так, добавление в культуральную среду специфического ингибитора ключевого фер-

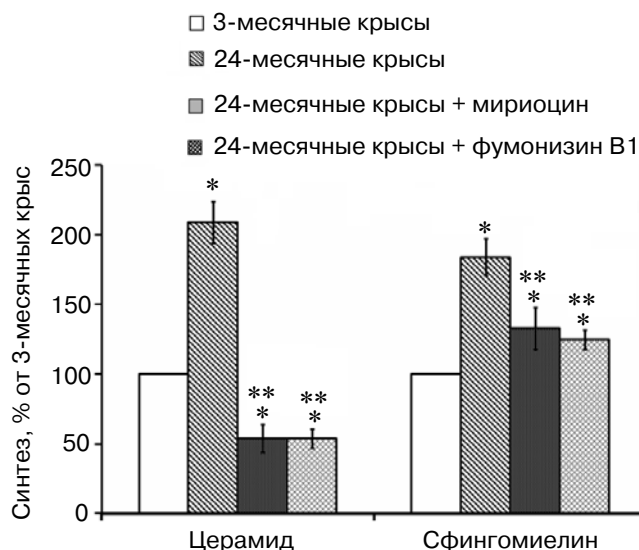


Рис. 1. Влияние мириоцина и фумонизина В1 на синтез церамида и сфингомиелина в изолированных гепатоцитах 24-месячных крыс, $n = 7$ (* – статистически значимо по сравнению с 3-месячными крысами, $p < 0,05$; ** – статистически значимо по сравнению с контролем – 24-месячными крысами, $p < 0,05$)

мента синтеза сфинголипидов мириоцина [18] или ингибитора синтеза церамида фумонизина В1 [19] подавляло синтез церамида и СФМ в присутствии [^{14}C]пальмитиновой кислоты (рис. 1). В то же время исследованиями, ранее проведенными в нашей лаборатории, было показано, что ингибиторы синтеза сфинголипидов мириоцин и фумонизин В1 снижали содержание церамида в гепатоцитах старых животных [20], однако эти изменения не достигали уровня сфинголипида у молодых крыс.

Для выяснения роли СФМаз в изменении содержания СФМ и церамида в клетках печени в старости изучали действие функционального ингибитора кислой СФМазы имипрамина [21] и неконкурентного ингибитора нейтральной СФМазы GW4869 [22]. Установлено, что имипрамин подавляет активность кислой СФМазы, но не влияет на нейтральную СФМазу в гепатоцитах (рис. 3, а). Внесение в среду культивирования клеток имипрамина снижает уровень церамидов в гепатоцитах старых крыс [20], но не до уровня молодых животных. Полученные результаты свидетельствуют о том, что имипрамин оказывает специфическое действие на активность кислой СФМазы и образование церамида в результате активации кислой СФМазы в клетках печени старых крыс.

Инкубация гепатоцитов, выделенных из печени 24-месячных животных, в присутствии GW4869 сопровождалась подавлением активности нейтральной СФМазы, но не кислого фермента (рис. 3, б). Содержание [^{14}C]церамида в клетках 3- и 24-месячных крыс и «старых» гепатоцитах, предварительно инкубированных в присутствии [^{14}C]пальмитиновой кислоты и смеси всех применяемых в работе ингибиторов обмена сфинголипидов, составляет 1312 ± 98 , 3654 ± 181 ($P < 0,05$) и 1787 ± 103 имп/мин $\times 10^7$ клеток.

Следующая серия экспериментов была посвящена изучению роли ингибиторов синтеза и деградации сфинголипидов в коррекции возрастного нарушения регуляции инсулином метаболизма глюкозы в клетках печени. Установлено резкое снижение способности старых клеток отвечать на действие инсулина, что выражалось в подавлении индуцированного инсулином поглощения глюкозы клетками (рис. 4) и синтеза гликогена (рис. 5) в гепатоцитах 24-месячных крыс по сравнению с 3-месячными.

Прединкубация гепатоцитов старых крыс в присутствии ингибиторов синтеза сфинголипидов (мириоцина) или СФМаз (имипрамина и GW4869) не оказывала значительного влияния на базальный уровень поглощения глюкозы

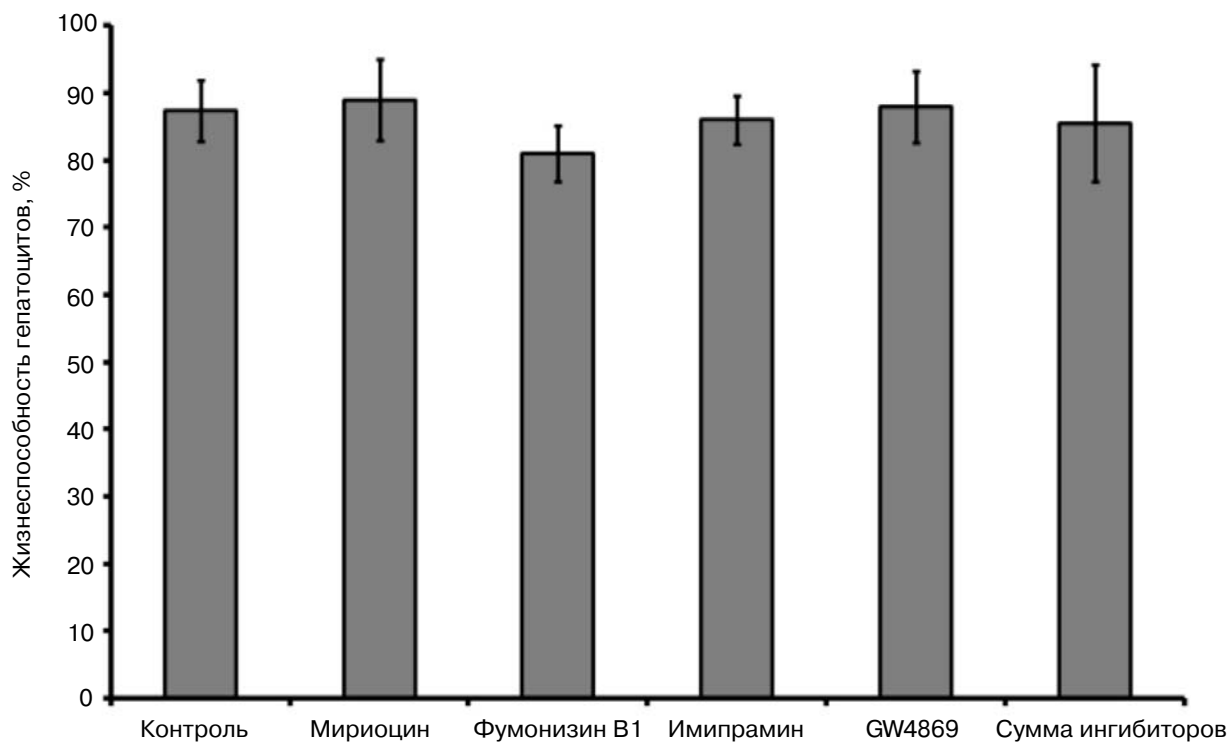


Рис. 2. Влияние ингибиторов метаболизма сфинголипидов на жизнеспособность гепатоцитов крыс 24-месячного возраста

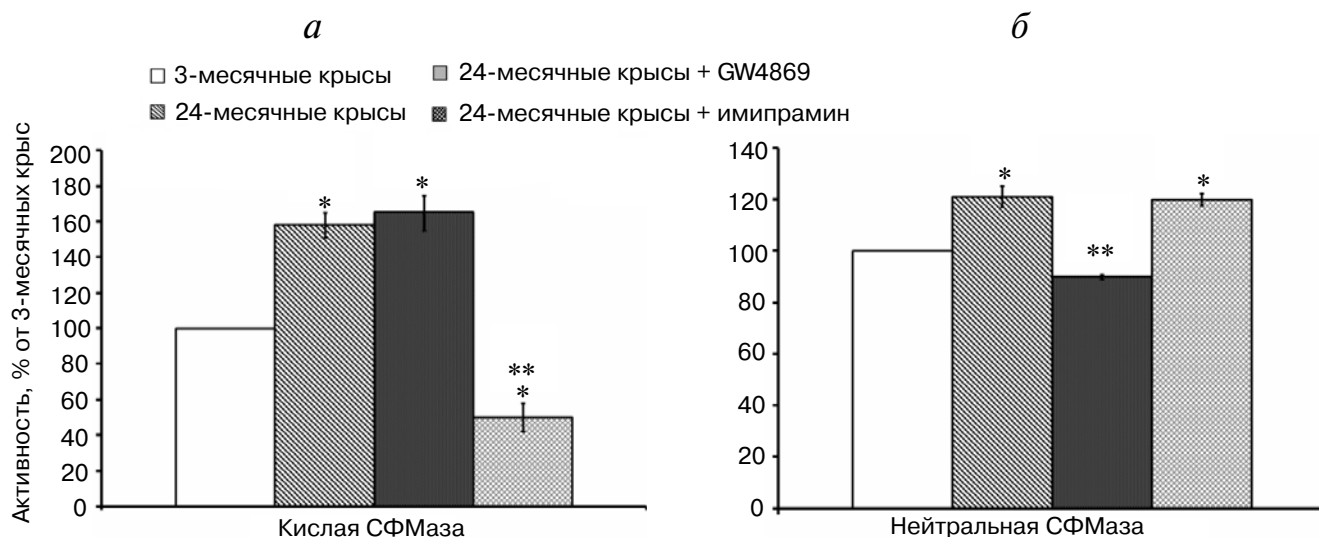


Рис. 3. Влияние имипрамина и GW4869 на активность кислой и нейтральной сфингомиелиназ в изолированных гепатоцитах 24-месячных крыс. *а* – Кислая сфингомиелиназа, $n = 7$; *б* – нейтральная сфингомиелиназа, $n = 7$ (* – статистически значимо по сравнению с 3-месячными крысами, $p < 0,05$; ** – статистически значимо по сравнению с контролем – 24-месячными крысами, $p < 0,05$)

(рис. 4) и синтеза гликогена (рис. 5). Мириоцин увеличивал индуцированное инсулином поглощение глюкозы на 32% (рис. 4) и синтез гликогена на 14% (рис. 5) по сравнению с контролем. Эти результаты согласуются с ранее полученными данными о незначительном усилении мириоцином инсулин-индуцированного метаболизма глюкозы гепатоцитами старых крыс [5]. Следует

отметить, что ингибитор синтеза церамида фумонизин В1 незначительно (на 12%) усиливал индукцию инсулином синтеза гликогена в клетках старых крыс. Имипрамин усиливал индукцию инсулином поглощения глюкозы (рис. 4) и синтеза гликогена (рис. 5) на 15 и 26% по сравнению с контролем соответственно. GW4869 усиливал индуцированное гормоном поглоще-

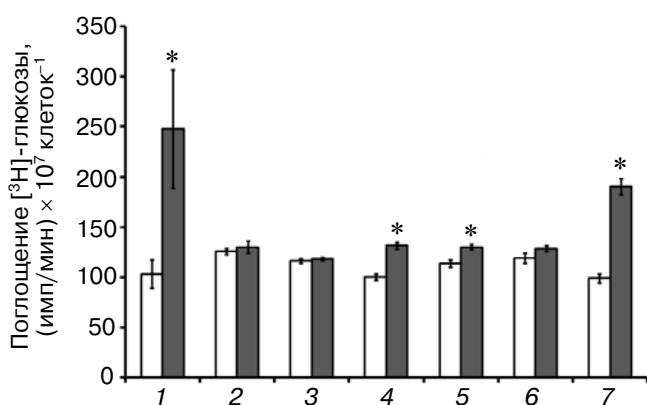


Рис. 4. Влияние ингибиторов метаболизма сфинголипидов на индукцию инсулином поглощения глюкозы гепатоцитами 24-месячных крыс, $n = 7-10$. Белые столбцы – контроль (0,9%-ный NaCl), серые столбцы – инсулин (* – статистически значимо по сравнению с контролем, $p < 0,05$); 3-месячные крысы: 1 – intactные клетки; 24-месячные крысы: 2 – intactные клетки, 3 – контроль, 4 – клетки + мириоцин, 5 – клетки + имипрамин, 6 – клетки + GW4869, 7 – клетки + сумма ингибиторов

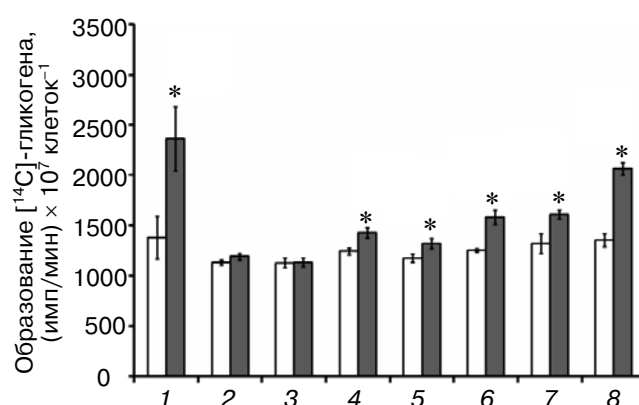


Рис. 5. Влияние ингибиторов метаболизма сфинголипидов на индукцию инсулином синтеза гликогена в гепатоцитах 24-месячных крыс, $n = 7-10$. Белые столбцы – контроль (0,9%-ный NaCl), серые столбцы – инсулин (* – статистически значимо по сравнению с контролем, $p < 0,05$); 3-месячные крысы: 1 – intactные клетки; 24-месячные крысы: 2 – intactные клетки, 3 – контроль, 4 – клетки + мириоцин, 5 – клетки + фумонизин В1, 6 – клетки + имипрамин, 7 – клетки + GW4869, 8 – клетки + сумма ингибиторов

ние глюкозы на 10% (рис. 4) и синтез гликогена (рис. 5) на 21% соответственно. Следует отметить, что ни один из применяемых ингибиторов не приводил к коррекции регуляции инсулином метаболизма глюкозы в клетках старых животных до уровня взрослых крыс. В то же время смесь ингибиторов обмена сфинголипидов способствовала усилению индуцированного инсулином поглощения старыми клетками глюкозы до уровня у 3-месячных крыс (рис. 4) и существенно усиливала гормон-индуцированный синтез гликогена в старых клетках (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Печень является одной из мишеней действия инсулина. Инсулинорезистентность клеток печени – важная черта метаболического синдрома, прогрессия которого приводит к развитию таких заболеваний, как диабет 2 типа, атеросклероз, и жировому перерождению печени. Развитие инсулинорезистентности в гепатоцитах происходит, как правило, на фоне гипергликемии, гиперинсулинемии, увеличения уровня свободных жирных кислот и их метаболитов и оксидативного стресса [23]. Инсулинорезистентность клеток печени сопровождается нарушением контроля метаболизма глюкозы, усилением синтеза жирных кислот и развитием стеатоза. Подавление сигналинга инсулина исключительно в печени у мышей, нокаутных по рецептору инсулина, приводит к развитию инсулинорезистентности, неспособности инсулина супрессировать продукцию глюкозы в печени и регулировать экспрессию генов в гепатоцитах [24]. Эти изменения происходят параллельно развитию гиперинсулинемии в результате комбинированного увеличения секреции инсулина и снижения клиренса гормона. С увеличением возраста нокаутных животных до 12 мес. происходят существенные морфологические изменения печени и ее функциональной активности. В большей части гепатоцитов полностью отсутствуют гранулы гликогена и обнаруживаются гигантские митохондрии, что характерно для действия оксидативного стресса при алкогольном повреждении печени. Эти данные свидетельствуют о том, что инсулиновый сигналинг играет критическую роль в регуляции гомеостаза глюкозы и поддержании нормальной функции печени.

Известно, что в старости существенно снижается способность печени запасать глюкозу на фоне усиления гликолиза и снижения глюконеогенеза [25]. В процессе старения усиливается частота возникновения инсулинорезистентности. В печени возникновение инсулинорезистент-

ности связывают с изменениями фосфорилирования рецептора инсулина и/или нарушениями начальных этапов сигнальной трансдукции. В изолированных гепатоцитах старых крыс существенно снижается способность инсулина индуцировать поглощение глюкозы и синтезировать гликоген по сравнению с молодыми животными [5] (рис. 4, 5). Учитывая то, что в клетках печени инсулин активирует поглощение глюкозы преимущественно непрямым путем, изменяя баланс между фосфорилированием/дефосфорилированием внутриклеточной глюкозы, можно предположить, что нарушение этого процесса в старости является важной причиной возрастной резистентности гепатоцитов к регулируемому действию инсулина. Однако установлено, что гепатоциты экспрессируют наряду с ГЛЮТ-2 регулируемый инсулином ГЛЮТ-4 [16]. Ввиду этого не исключено, что нарушение в старости экспрессии и/или транслокации инсулинчувствительного транспортера глюкозы в клетках печени является одной из причин нарушения регуляции инсулином метаболизма глюкозы. В старости происходит существенное увеличение содержания в печени известного индуктора инсулинорезистентности – церамида [25–27]. Одним из механизмов, с помощью которого церамид может подавлять индуцированный инсулином транспорт глюкозы в клетках-мишенях, является изменение жидкости мембран и транслокации ГЛЮТ-4 в плазматические мембраны [28]. В то же время роль церамида в развитии инсулинорезистентности в клетках печени остается под вопросом [29]. Остается невыясненным, нарушение каких сфинголипидных метаболических путей приводит к развитию резистентности старых клеток печени к действию инсулина.

Церамиды занимают центральное место в синтезе всех сложных сфинголипидов, локализованы в мембранах клеток и накапливаются в клетках в ответ на действие стресса и в старости [25–27]. Существует три основных пути продукции церамидов в клетках. Наиболее изученным является путь синтеза церамида *de novo*, который начинается реакцией конденсации серина и пальмитоил-CoA и образованием 3-кетосфинганина. Эта реакция катализируется скоростью-лимитирующим ферментом – СПТ. Последующая активация 3-кетосфинганинредуктазы (ЕС 1.1.1.102), (дигидро)церамидсинтазы (ЕС 2.3.1.24) и (дигидро)церамиддесатуразы (ЕС 3.4.24.81) приводит к превращению этих промежуточных продуктов в церамид. Гидролиз СФМ – следующий путь образования церамида. Различные СФМазы, различающиеся по оптимуму рН и локализации в клетке, гидролизуют СФМ, что приводит

к высвобождению фосфорилхолина и накоплению церамида. Учитывая то, что СФМ является наиболее распространенным сфинголипидом в клетках млекопитающих, можно полагать, что СФМаза-зависимый путь играет важную роль в накоплении церамида. Однако и другие сложные сфинголипиды могут являться источником церамида в клетках. Концентрация церамида в клетках может увеличиваться в результате деградации глюкозилцерамида и церамид-1-фосфата или в процессе рециклирования сфингозина.

В настоящей работе установлено, что при культивировании клеток печени старых животных в присутствии одного из ингибиторов синтеза или деградации сфинголипидов происходит снижение уровня церамида, однако его содержание не восстанавливается до уровня, наблюдаемого в гепатоцитах взрослых крыс, в то время как в условиях сочетанного действия мириоцина, фумонизина В1, имипрамина и GW4869 происходила коррекция содержания церамида в старых клетках до уровня, детектируемого в гепатоцитах молодых крыс. Полученные данные согласуются с ранее полученными результатами об изменении различных путей обмена сфинголипидов в старых клетках [20, 27] и свидетельствуют о важной роли кислой и нейтральной СФМаз и синтеза сфинголипидов *de novo* в накоплении церамида в гепатоцитах в старости. В то же время активация в старых клетках синтеза СФМ может происходить в ответ на снижение массы СФМ и накопления предшественника — церамида и является адаптационным процессом. Остается, однако, невыясненным вопрос: активация каких путей обмена сфинголипидов в старости приводит к нарушению чувствительности клеток печени к действию инсулина.

Резистентность тканей к действию инсулина, индуцированная глюкокортикоидами, насыщенными липидами или ожирением, ассоциирована с повышением синтеза церамида *de novo* [30, 31]. Длительное введение мириоцина *ob/ob* мышам или животным с индуцированным высококалорийной диетой ожирением предотвращало накопление церамида в плазме крови, скелетной мускулатуре и печени и улучшало гомеостаз глюкозы у диабетических крыс линии Zuker [32, 33]. Мириоцин или циклосерин отменяли индуцированное пальмитатом накопление церамида, ингибирование ПКВ и фосфорилирование киназы 3 β -гликогенсинтазы (ЕС 2.7.11.26) в миоцитах C2C12 и миотрубочках L6 *in vitro* [34–36]. При этом мириоцин существенно подавлял активность СПТ и не влиял на экспрессию фермента. Известно, что мириоцин является специфическим ингибитором СПТ [18], широко используемым для выяснения роли СПТ в

накоплении церамидов в жировой и мышечной тканях и печени при избыточном поступлении жиров в организм и развитии ожирения. Настоящими исследованиями установлено, что инкубация изолированных гепатоцитов 24-месячных крыс в присутствии мириоцина сопровождалось снижением содержания вновь синтезированных из [¹⁴C]пальмитиновой кислоты церамидов и СФМ и улучшала индуцированное инсулином поглощение глюкозы и синтез гликогена в клетках. Следует отметить, что мириоцин не изменял уровень сфинголипидов и чувствительность старых клеток до уровня молодых животных, что может быть связано с тем, что в процессе старения происходит активация и других путей обмена сфинголипидов. Так, установлено, что в старости в клетках печени активируется церамидсинтаза, кислая и нейтральная СФМазы [18, 27]. Действительно, специфический ингибитор церамидсинтазы — фумонизин В1 снижал синтез церамида и СФМ в старых клетках. Применяемые в настоящей работе функциональный ингибитор кислой СФМазы имипрамин и специфический ингибитор нейтральной СФМазы GW4869 существенно снижали активность кислой и нейтральной СФМаз соответственно и повышенный в старости уровень церамида в клетках печени [20]. Полученные данные о том, что ингибитор кислой СФМазы имипрамин не блокировал активность нейтральной СФМазы, а GW4869, подавляя активность нейтральной СФМазы, не влиял на активность кислого фермента, свидетельствуют о специфичности действия применяемых ингибиторов на клетки старых животных.

Тот факт, что под действием ингибиторов СФМаз усиливалась индукция инсулином метаболизма глюкозы на фоне сниженного содержания церамида, свидетельствует о вкладе СФМаза-зависимой продукции церамида в развитие резистентности клеток к действию инсулина в старости. В пользу данного предположения свидетельствуют данные о том, что одним из механизмов, с помощью которого церамид, образованный в мембранах клеток в результате активации СФМазы, ингибирует сигналинг инсулина, связан с активацией ФНО- α серинтреониновых киназ [37]. Внесение в среду инкубации клеток мишеней действия инсулина (адипоцитов, гепатоцитов и мышечных клеток) экзогенной СФМазы имитирует действие ФНО- α , подавляет сигнальную трансдукцию инсулина и стимуляцию гормоном транспорта и метаболизма глюкозы [38–40]. Инкубация гепатоцитов крыс в присутствии СФМазы *Bacillus cereus* приводит к ингибированию гликогенсинтазы (ЕС 2.4.1.11) [41]. Установлено, что сама экзогенная СФМаза

оказывает подавляющее действие на синтез гликогена в клетках печени, а не продукты СФМазной активности — керамида. Как в процессе старения [42], так и при развитии ожирения [41] наблюдается процесс хронического воспаления, в результате которого усиливается продукция воспалительных медиаторов, таких как ФНО- α и ИЛ, вовлеченных в развитие инсулинорезистентности. Содержание циркулирующего ФНО- α [42] и ИЛ-1 β в печени [43] увеличивается в процессе старения. Изменение с возрастом продукции ФНО- α ассоциировано с развитием гипергликемии и гиперинсулинемии [44]. ФНО- α вызывает быструю активацию СФМазы и накопление керамида [45–49], однако в последующем активирует синтез керамида *de novo* и индуцирует существенное накопление вновь синтезированного керамида в клетках.

Сверхэкспрессия нейтральной мембраносвязанной СФМазы во многом определяет сверхчувствительность старых гепатоцитов к действию ИЛ-1 β [42]. Ингибирование нейтральной СФМазы в гепатоцитах, полученных из печени старых крыс, с помощью психостатина или siRNA восстанавливает способность старых клеток адекватно отвечать на действие цитокина. Установлено, что ИЛ-1 β , непосредственно воздействуя на клетки печени (клетки гепатомы FAO, HepG2 и изолированные гепатоциты), снижает индуцированное инсулином фосфорилирование рецептора инсулина, субстрата инсулинового рецептора, ПКВ, киназы 3 β -гликогенсинтазы и, таким образом, вызывает развитие резистентности клеток к действию инсулина [50]. Учитывая эти данные и то, что керамида имитируют эффекты ИЛ-1 β на гепатоциты [51, 52], можно полагать, что опосредованное нейтральной СФМазой накопление керамида в клетках старых крыс является одной из причин развития их резистентности к действию инсулина. В то же время только в условиях восстановления процессов синте-

за и деградации СФМ и массы керамида и СФМ в старых клетках до уровня молодых животных происходит коррекция индуцированного в старости состояния резистентности гепатоцитов к действию инсулина.

Таким образом, установлена важная роль как процесса деградации, так и синтеза сфинголипидов *de novo* в изменении в старости содержания СФМ и керамида в гепатоцитах. Нарушение регуляции инсулином поглощения и метаболизма глюкозы в гепатоцитах в старости происходит на фоне активации синтеза сфинголипидов и увеличения содержания вновь синтезированного керамида и СФМ в клетках печени. Ингибирование одного из ключевых ферментов синтеза (СПТ или керамидсинтазы) или деградации сфинголипидов (кислой или нейтральной СФМазы) с помощью специфических ингибиторов сопровождается частичным снижением содержания керамида и СФМ и улучшением ответа клеток на действие инсулина в гепатоцитах старых животных. При одновременном подавлении активности СПТ, керамидсинтазы и СФМаз уровень керамида и способность «старых» клеток адекватно отвечать на действие инсулина восстанавливается до уровня молодых животных. Полученные данные свидетельствуют о том, что в старости не только вновь синтезированные керамид и СФМ, но и керамид, образующийся в результате деградации СФМ, играют важную роль в развитии резистентности гепатоцитов к действию инсулина.

Работа выполнена при финансовой поддержке научно-исследовательской программы «Роль метаболитов сфингомиелинового цикла в развитии резистентности клеток к действию физиологических стимулов в процессе старения» (государственная регистрация № 0111U010555).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Holland, W.L., and Summers, S.A. (2008) Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from *in vivo* manipulation of sphingolipid metabolism, *Endocr. Rev.*, **29**, 381–402.
2. Babenko, N.A. (2011) in *Saturated fats: metabolism, disease risks and public awareness* (Langella, J.P., ed.), Nova Science Publishers, N.Y., pp. 71–97.
3. Stratford, S., DeWald, D.B., and Summers, S.A. (2001) Ceramide dissociates 3'-phosphoinositide production from pleckstrin homology domain translocation, *Biochem. J.*, **354**, 359–368.
4. Ugi, S., Imamura, T., Maegawa, H., Egawa, K., Yoshizaki, T., Shi, K., Obata, T., Ebina, Y., Kashiwagi, A., and Olefsky, J.M. (2004) Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes, *Mol. Cell Biol.*, **24**, 8778–8789.
5. Babenko, N.A., and Kharchenko, V.S. (2012) Ceramides inhibit phospholipase D-dependent insulin signaling in liver cells of old rats, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 180–186.
6. Pileggi, A., Fenjves, E.S., Klein, D., Ricordi, C., and Pastori, R.L. (2004) Protecting pancreatic beta-cells, *IUBMB Life*, **56**, 387–394.
7. Zhao, H., Przybylska, M., Wu, I.H., Zhang, J., Siegel, C., Komarnitsky, S., Yew, N.S., and Cheng, S.H. (2007) Inhibiting glycosphingolipid synthesis improves glycemic control and insulin sensitivity in animal models of type 2 diabetes, *Diabetes*, **56**, 1210–1218.

8. Adams, J.M. 2nd, Pratipanawat, T., Berria, R., Wang, E., DeFronzo, R.A., Sullards, M.C., and Mandarino, L.J. (2004) Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans, *Diabetes*, **53**, 25–31.
9. Yamashita, T., Hashiramoto, A., Haluzik, M., Mizukami, H., Beck, S., Norton, A., Kono, M., Tsuji, S., Daniotti, J.L., Werth, N., Sandhoff, R., Sandhoff, K., and Proia, R.L. (2003) Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 3445–3449.
10. Li, Zh., Zhang, H., Liu, J., Liang, Ch.-P., Li, Ya., Li, Yu., Teitelman, G., Beyer, Th., Bui, H.H., Peake, D., Zhang, Y., Sanders, Ph., Kuo, M.-Sh., Park, T.-S., Cao, G., and Jiang, X.-Ch. (2011) Reducing plasma membrane sphingomyelin increases insulin sensitivity, *Mol. Cell Biol.*, **31**, 4205–4218.
11. Kralik, S.F., Liu, P., Leffler, B.J., and Elmendorf, J.S. (2002) Ceramide and glucosamine antagonism of alternate signaling pathways regulating insulin- and osmotic shock-induced glucose transporter 4 translocation, *Endocrinology*, **143**, 37–46.
12. Skovbro, M., Baranowski, M., Skov-Jensen, C., Flint, A., Dela, F., Gorski, J., and Helge, J.W. (2008) Human skeletal muscle ceramide content is not a major factor in muscle insulin sensitivity, *Diabetologia*, **51**, 1253–1260.
13. Zeghari, N., Younsi, M., Meyer, L., Donner, M., Drouin, P., and Ziegler, O. (2000) Adipocyte and erythrocyte plasma membrane phospholipid composition and hyperinsulinemia: a study in nondiabetic and diabetic obese women, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **24**, 1600–1607.
14. Mitsutake, S., Zama, K., Yokota, H., Yoshida, T., Tanaka, M., Mitsui, M., Ikawa, M., Okabe, M., Tanaka, Y., Yamashita, T., Takemoto, H., Okazaki, T., Watanabe, K., and Igarashi, Y. (2011) Dynamic modification of sphingomyelin in lipid microdomains controls development of obesity, fatty liver, and type 2 diabetes, *J. Biol. Chem.*, **286**, 28544–28555.
15. Петренко А.Ю., Сукач А.Н., Росляков А.Д. (1991) Выделение гепатоцитов крыс неферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активности, *Биохимия*, **56**, 1647–1651.
16. Brutman-Barazani, T., Horovitz-Fried, M., Aga-Mizrahi, Sh., Brand, Ch., Brodie, Ch., Rosa, J., and Sampson, S.R. (2012) Protein kinase C δ but not PKC α is involved in insulin-induced glucose metabolism in hepatocytes, *J. Cell. Biochem.*, **113**, 2064–2076.
17. Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911–917.
18. Wadsworth, J.M., Clarke, D.J., McMahon, S.A., Lowther, J.P., Beattie, A.E., Langridge-Smith, P.R., Broughton, H.B., Dunn, T.M., Naismith, J.H., and Campopiano, D.J. (2013) The chemical basis of serine palmitoyltransferase inhibition by myriocin, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 14276–14285.
19. Wang, E., Norred, W.P., Bacon, C.W., Riley, R.T., and Merrill, A.H., Jr. (1991) Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*, *J. Biol. Chem.*, **266**, 14486–14490.
20. Babenko, N.A., Hassouneh, L.Kh.M., Kharchenko, V.S., and Garkavenko, V.V. (2012) Vitamin E prevents the age-dependent and palmitate-induced disturbances of sphingolipid turnover in liver cells, *Age (Dordr)*, **34**, 905–915.
21. Kornhuber, J., Tripal, Ph., Reichel, M., Muhle, C., Rhein, C., Muehlbacher, M., Groemer, T.W., and Gulbins, E. (2010) Functional inhibitors of acid sphingomyelinase (FIASMs): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications, *Cell Physiol. Biochem.*, **26**, 9–20.
22. Luberto, C., Hassler, D.F., Signorelli, P., Okamoto, Y., Sawai, H., Boros, E., Hazen-Martin, D.J., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., and Smith, G.K. (2002) Inhibition of tumor necrosis factor-induced cell death in MCF7 by a novel inhibitor of neutral sphingomyelinase, *J. Biol. Chem.*, **277**, 41128–41139.
23. Leclercq, I.A., Morais, A.D.S., Schroyen, B., van Hul, N., and Geerts, A. (2007) Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cell: mechanisms and consequences, *J. Hepatol.*, **47**, 142–156.
24. Dodson, M.M., Kulkarni, R.N., Postic, K., Previs, S.F., Shulman, G.I., Magnuson, M.A., and Khan, R.C. (2000) Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction, *Mol. Cell*, **6**, 87–97.
25. Le Couteur, D.G., Everitt, A., and Lebel, M. (2009) The aging liver, *Geriatrics and Aging*, **12**, 319–322.
26. Babenko, N.A., and Semenova, Ya.A. (2010) Effects of long-term fish oil-enriched diet on the sphingolipid metabolism in brain of old rats, *Exp. Gerontol.*, **45**, 375–380.
27. Babenko, N.A., and Shakhova, E.G. (2014) Long-term food restriction prevents aging-associated sphingolipid turnover dysregulation in the brain, *Arch. Gerontol. Geriat.*, **58**, 420–426.
28. Lightle, S.A., Oakley, J.I., and Nikolova-Karakashian, M.N. (2000) Activation of sphingolipid turnover and chronic generation of ceramide and sphingosine in liver during aging, *Mech. Ageing Dev.*, **120**, 111–125.
29. Larsen, P.J., and Tennagels, N. (2014) On ceramides, other sphingolipids and impaired glucose homeostasis, *Mol. Metab.*, **28**, 252–260.
30. Galbo, T., and Shulman, G.I. (2013) Lipid induced hepatic insulin resistance, *Ageing (Albany, N.Y.)*, **5**, 582–583.
31. Holland, W.L., Brozinick, J.T., Wang, L.-P., Hawkins, E.D., Sargent, K.M., Liu, Y., Narra, K., Hoehn, K.L., Knotts, T.A., Siesky, A., Nelson, D.H., Karathanasis, S.K., Fontenot, G.K., Birnbaum, M.J., and Summers, S.A. (2007) Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance, *Cell Metab.*, **5**, 167–179.
32. Yang, G., Badeanlou, L., Bielawski, J., Roberts, A.J., and Hannun, Y.A. (2009) Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **297**, 211–224.
33. Ussher, J.R., Koves, T.R., Cadete, V.J.J., Zhang, L., Jaswal, J.S., Swyrd, S.J., Lopaschuk, D.G., Proctor, S.D., Keung, W., Muoio, D.M., and Lopaschuk, G.D. (2010) Inhibition of *de novo* ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption, *Diabetes*, **59**, 2453–2464.
34. Chavez, J.A., Knotts, T.A., Wang, L.-P., Li, G., Dobrowsky, R.T., Florant, G.L., and Summers, S.A. (2003) A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids, *J. Biol. Chem.*, **278**, 10297–10303.
35. Powell, D.J., Turban, S., Gray, A., Hajdich, E., and Hundal, H.S. (2004) Intracellular ceramide synthesis and protein kinase Czeta activation play an essential role in palmitate-induced insulin resistance in rat L6 skeletal muscle cells, *Biochem. J.*, **382**, 619–629.
36. Watson, M.L., Coghlan, M., and Hundal, H.S. (2009) Modulating serine palmitoyl transferase (SPT) expression and activity unveils a crucial role in lipid-induced insulin resistance in rat skeletal muscle cells, *Biochem. J.*, **417**, 791–801.
37. Teruel, T., Hernandez, R., and Lorenzo, M. (2001) Ceramide mediates insulin resistance by tumor necrosis factor-alpha in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state, *Diabetes*, **50**, 2563–2571.

38. Peraldi, P., Hotamisligil, G.S., Buurman, W.A., White, M.F., and Spiegelman, B.M. (1996) Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase, *J. Biol. Chem.*, **271**, 13018–13022.
39. Kanety, H., Hemi, R., Papa, M.Z., and Karasik, A. (1996) Sphingomyelinase and ceramide suppress insulin-induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-1, *J. Biol. Chem.*, **271**, 9895–9897.
40. Begum, N., and Ragolia, L. (1996) Effect of tumor necrosis factor-alpha on insulin action in cultured rat skeletal muscle cells, *Endocrinol.*, **137**, 2441–2446.
41. van Sluijters, D.A., van Woerkom, G.M., Aerts, J.M.F.G., and Meijer, A.J. (1999) Sphingomyelinase treatment of rat hepatocytes inhibits cell-swelling-stimulated glycogen synthesis by causing cell shrinkage, *Eur. J. Biochem.*, **266**, 653–659.
42. Rutkute, K., Karakashian, A.A., Giltiay, N.V., Dobierzewska, A., and Nikolova-Karakashian, M.N. (2007) Aging in rat causes hepatic hyperresponsiveness to interleukin-1beta which is mediated by neutral sphingomyelinase-2, *Hepatology*, **46**, 1166–1176.
43. Lagathu, C., Yvan-Charvet, L., Bastard, J.P., Maachi, M., Quignard-Boulange, A., Capeau, J., and Caron, M. (2006) Long-term treatment with interleukin-1beta induces insulin resistance in murine and human adipocytes, *Diabetologia*, **49**, 2162–2173.
44. Bruunsgaard, H. (2002) Effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in elderly populations, *Eur. Cytokine Netw.*, **13**, 389–391.
45. Rikans, L.E., DeCicco, L.A., Hornbrook, K.R., and Yamano, T. (1999) Effect of age and carbon tetrachloride on cytokine concentrations in rat liver, *Mech. Ageing Dev.*, **108**, 173–182.
46. Kirwan, J.P., Krishnan, R.K., Weaver, J.A., Del Aguila, L.F., and Evans, W.J. (2001) Human aging is associated with altered TNF-alpha production during hyperglycemia and hyperinsulinemia, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **281**, 1137–1143.
47. Bruce, C.R., and Dyck, D.J. (2004) Cytokine regulation of skeletal muscle fatty acid metabolism: effect of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **287**, 616–621.
48. Steinberg, G.R., Michell, B.J., van Denderen, B.J., Watt, M.J., Carey, A.L., Fam, B.C., Andrikopoulos, S., Proietto, J., Gorgun, C.Z., Carling, D., Hotamisligil, G.S., Febbraio, M.A., Kay, T.W., and Kemp, B.E. (2006) Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling, *Cell Metab.*, **4**, 465–474.
49. Dyck, D.J., Heigenhauser, G.J., and Bruce, C.R. (2006) The role of adipokines as regulators of skeletal muscle fatty acid metabolism and insulin sensitivity, *Acta Physiol. (Oxf.)*, **186**, 5–16.
50. Nov, O., Kohl, A., Lewis, E.C., Bashan, N., Dvir, I., Ben-Shlomo, S., Fishman, S., Wueest, S., Konrad, D., and Rudich, A. (2010) Interleukin-1beta may mediate insulin resistance in liver-derived cells in response to adipocyte inflammation, *Endocrinology*, **151**, 4247–4256.
51. Dobierzewska, A., Shi, L., Karakashian, A.A., and Nikolova-Karakashian, M.N. (2012) Interleukin 1β regulation of FoxO1 protein content and localization: evidence for novel ceramide-dependent mechanism, *J. Biol. Chem.*, **287**, 44749–44760.
52. Ugi, S., Imamura, T., Maegawa, H., Egawa, K., Yoshizaki, T., Shi, K., Obata, T., Ebina, Y., Kashiwagi, A., and Olefsky, J.M. (2004) Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes, *Mol. Cell Biol.*, **24**, 8778–8789.

EFFECTS OF INHIBITORS OF KEY ENZYMES OF SPHINGOLIPID METABOLISM ON INSULIN-INDUCED GLUCOSE UPTAKE AND GLYCOGEN SYNTHESIS IN LIVER CELLS OF OLD RATS

N. A. Babenko*, V. S. Kharchenko

*Kharkov V. N. Karazin National University, Institute of Biology,
pl. Svobody 4, Kharkov 61022, Ukraine; fax: +38(057)335-2923,
E-mail: babenko@univer.kharkov.ua*

Received June 6, 2014

Revision received June 8, 2014

Sphingolipids play an important role in the development of insulin resistance. Ceramides are the most potent inhibitors of insulin signal transduction. Ceramides are generated in response to stress stimuli and in old age. In this work, we studied the possible contribution of different pathways of sphingolipid metabolism in age-dependent insulin resistance development in liver cells. Inhibition of key enzymes of sphingolipid synthesis (serine palmitoyl transferase, ceramide synthase) and degradation (neutral and acid SMases) by means of specific inhibitors, myriocin, fumonisins B1, imipramine, and GW4869 followed with the reduction of ceramide level partly improved insulin regulation of glucose metabolism in «old» hepatocytes. Imipramine and GW4869 decreased significantly the acid and neutral SMase activities, respectively. Treatment of «old» cells with myriocin or fumonisin B1 reduced the elevated at old age ceramide and SM synthesis. Ceramide and SM levels and glucose metabolism regulation by insulin could be improved with concerted action of all tested inhibitors of sphingolipid turnover on hepatocytes. The data demonstrate that not only newly synthesized ceramide and SM, but also neutral and acid SMase-dependent ceramide accumulation plays an important role in age-induced insulin resistance development.

Key words: hepatocytes, insulin resistance, aging, myriocin, fumonisin B1, imipramine, GW4869