

УДК 577.125.8:591.481.1:616-001.18

**ВЛИЯНИЕ ИСКУССТВЕННОГО ГИПОБИОЗА
НА КОЛИЧЕСТВО ЛИПИДОВ В ТИМОЦИТАХ КРЫС**

© 2012 г.

О.В. Быкова, Л.Н. Маркевич, И.К. Коломийцева

Институт биофизики клетки РАН, Пущино

lelechek@list.ru

Поступила в редакцию 01.12.2011

Исследовано влияние искусственного гипобиоза в условиях гипоксии – гиперкапнии крыс на количество фосфолипидов и нейтральных липидов в тимоцитах. Впервые показано участие кардиолипина в адаптивных реакциях тимоцитов на состояние искусственного гипобиоза. Показана адаптивная роль жирных кислот, диглицеридов и фосфолипидов в метаболическом ответе тимоцитов на искусственный гипобиоз крыс.

Ключевые слова: тимоциты, искусственный гипобиоз, фосфолипиды, нейтральные липиды.

Введение

Актуальной проблемой космической биологии и практической медицины является исследование адаптации человека и животных к низким температурам окружающей среды. У незимоспящих млекопитающих состояние гипометаболизма можно создать в условиях гипотермии с использованием гипоксии–гиперкапнических газовых сред. При этом животные впадают в состояние так называемого «холодового наркоза» или искусственного гипобиоза со снижением уровня метаболизма в 6–7 раз при температуре тела 14–23°C. Из этого состояния животные возвращаются к норме без патологических последствий [1, 2]. Искусственная гипотермия широко применяется в медицинской практике, это связано со значительным снижением обмена веществ и потребления кислорода при пониженной температуре с последующим восстановлением физиологических функций после нормализации температуры. Различают общую и локальную гипотермию. Общая гипотермия подразделяется на мягкую (35–32°C), при которой обычно используется легкая нейровегетативная фармакологическая блокада, и умеренную (32–27°C) с современным многокомпонентным интубационным наркозом, с искусственной аппаратной вентиляцией легких, релаксацией и нейровегетативной блокадой [3–6]. Для адаптационной медицины, космической биологии и физиологии стресса представляет большой интерес изучение влияния глубокой гипотермии (ниже 27°C). В этом плане перспективны изучение состояния искусственного гипобиоза у незимоспящих млекопитающих [7, 8].

В адаптации живых систем к экстремальным температурам окружающей среды большая роль приписывается липидам [9–11]. Особый интерес представляет исследование липидов ядер в связи с ролью липидов в сигнальных системах клетки [12–14]. Несмотря на интерес к проблеме роли липидов в гипотермии, влияние низких температур и искусственного гипобиоза на липиды тканей млекопитающих не исследовано.

Экспериментальная часть

Цель нашей работы – выяснение участия липидов ядер клеток тимуса в адаптации млекопитающих к искусственному гипобиозу. Тимус является активно пролиферирующим и одним из основных органов иммунной системы. Тимус очень чувствителен к действию различных факторов, вызывающих апоптоз клеток, и состоит на 95–98% из лимфоцитов [15]. Известно, что время жизни делящихся клеток тимуса составляет примерно 1 сутки [16]. Основную часть объема тимоцита занимает ядро. Липидный состав тимоцитов близок к липидному составу ядер тимоцитов [17].

Опыты проводили на крысах-самцах *Wistar* массой 190–220 г. Для введения в состояние искусственного гипобиоза использовали метод гипоксии-гиперкапнии [2]. Крыс выдерживали в герметичной камере объемом 5 л при температуре среды 1–2°C в течение 3.5–4 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)*).

Таблица

Количество индивидуальных липидов в тимоцитах крыс в состоянии искусственного гипобиоза и через 24 часа после окончания процедуры охлаждения (мкг липида / 1 мг белка)

Липиды	Нормотермия	Искусственный гипобиоз	Через 24 часа после окончания охлаждения
Свободные жирные кислоты	18.9±1.8 (5)	34.4±4.2* (4)	14.6±2.1 (3)
Моноглицериды	6.9±0.8 (6)	7.7±2.8 (4)	9.3±2.1 (6)
Диглицериды	5.6±0.7 (7)	5.8±2.2 (4)	9.6±1.5* (5)
Холестерин	11.5±0.8 (5)	12.5±1.4 (4)	12.7±1.4 (3)
Сфингомиелин	2.8±0.8 (9)	1.7±0.5 (4)	2.7±0.4 (5)
Фосфатидилхолин	42.7±1.9 (7)	55.0±5.2* (5)	49.0±5.1 (4)
Фосфатидилсерин	5.5±0.9 (8)	8.7±1.4 (6)	13.1±0.9* (4)
Фосфатидилинозитол	5.0±0.7 (7)	10.5±2.3* (5)	11.3±0.5** (4)
Кардиолипин	3.9±0.4 (7)	2.3±0.3* (3)	1.5±0.1** (3)
Фосфатидилэтанолламин	17.8±0.6 (7)	21.9±1.4* (5)	18.2±3.2 (5)
Белок, мкг/мг ткани	54.7±9.0 (6)	41.6±5.9 (4)	57.5±5.8 (5)

* – Различие достоверно по отношению к контролю при $p < 0.05$; ** – различие достоверно по отношению к контролю при $p < 0.001$; в скобках указано количество экспериментов.

Крыс декапитировали согласно принятым в ИБК РАН правилам [18] в состояниях нормотермии (t° тела 37°C), искусственного гипобиоза (t° тела $15\text{--}18^{\circ}\text{C}$) и через 24 часа после окончания процедуры охлаждения (t° тела 37°C). При получении суспензии тимоцитов суммировали материал от 3-х животных. Липиды экстрагировали, очищали, разделяли методом ТСХ и определяли количество индивидуальных нейтральных липидов и фосфолипидов [19, 20]. Количество белка определяли по Лоури. Для статистической обработки использовали t -тест Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

В состоянии искусственного гипобиоза крыс в тимоцитах увеличивалось содержание фосфатидилхолина (ФХ) на 28%, фосфатидилинозитола (ФИ) в 2 раза, фосфатидилэтанолламина (ФЭА) на 23% и свободных жирных кислот почти в 2 раза, количество кардиолипина уменьшалось на 59% (таблица); через 24 часа после окончания процедуры охлаждения содержание фосфатидилхолина, фосфатидилэтанолламина и свободных жирных кислот приходило в норму, оставалось повышенным количество фосфатидилинозитола в 2.3 раза, увеличивалось содержание фосфатидилсерина (ФС) в 2.4 раза и диглицеридов в 1.7 раз, количество кардиолипина уменьшалось в 2.3 раза. Количество остальных липидов, а именно холестерина, моноглицеридов, сфингомиелина (СМ), не изменялось.

ФХ, как и другие липиды, является участником сигнальных систем, его метаболизм тесно связан с метаболизмом СМ, ФЭА, ФС и ФИ [21]. На Т-лимфоцитах крови показано, что синтез *de novo* и накопление ФХ и рост отношения

фосфатидилхолин/сфингомиелин происходят на стадии активации пролиферации в культуре тимоцитов, стимулированных ИЛ-II [22]. Искусственный гипобиоз вызывает в тимоцитах рост отношения ФХ/СМ за счет увеличения количества ФХ. Можно полагать, что повышение уровня ФХ, ФЭА и стойкое увеличение ФИ (таблица) имеют адаптивный характер и направлены на поддержание клеточной пролиферации.

Концентрация кардиолипина в ядрах тимоцитов равна его концентрации в клетке [17]. Можно предположить, что кардиолипин ядер вносит существенный вклад в кардиолипин тимоцитов, а искусственный гипобиоз оказывает влияние на кардиолипин ядер тимоцитов. Известно, что среди ДНК-связанных липидов кардиолипин занимает особое место, весь кардиолипин хроматина локализован в ДНК и ядерном матриксе и регулирует, например, активность ДНК- и РНК-полимераз, протеинкиназы С [23]. Стойкое снижение содержания кардиолипина, сохраняющееся через 24 часа после окончания охлаждения, на фоне снижения активности ОДК и пролиферативной активности в тимоцитах [24] может свидетельствовать о роли кардиолипина в клеточной пролиферации и нарушениях функционирования внутренней мембраны митохондрий тимоцитов [25, 26].

У крыс в состоянии искусственного гипобиоза происходил рост количества свободных жирных кислот в тимоцитах. Известно, что в состоянии искусственного гипобиоза увеличивается количество насыщенных жирных кислот в крови и сердечной мышце крыс [7], такое же изменение в количестве жирных кислот отмечено в крови при разной степени гипотермии и других видах стресса и рассматривается как

следствие общей реакции организма млекопитающих [9].

Через 24 часа после окончания процедуры охлаждения количество основных фосфолипидов не отличалось от контрольных значений. Было отмечено увеличение количества минорных фосфолипидов, таких как фосфатидилинозитол и фосфатидилсерин более чем в 2 раза (таблица). Таким образом, по сравнению с состоянием гипобиоза происходит уменьшение количества ФХ и ФЭА, соответственно растет количество диглицеридов, что свидетельствует об активации сигнальных путей и функциональной роли липидов. Из анализа результатов следует, что липиды играют важную функциональную роль в адаптивном ответе, участвуя в регуляции пролиферации и метаболизме тимоцитов в состоянии искусственного гипобиоза крыс.

Заключение

Состояние искусственного гипобиоза при температуре тела 15–18°C в условиях гипоксии-гиперкапнии вызывает адаптивные изменения метаболизма липидов, обеспечивающие выживание млекопитающих в экстремальных условиях. Изучение механизмов искусственных гипометаболических состояний представляет интерес для адаптационной медицины.

В настоящем исследовании показана функциональная роль липидов в механизмах адаптации незимоспящих млекопитающих к искусственному гипобиозу. Исследовано участие липидов в динамике функционального состояния тимоцитов в ответ на искусственный гипобиоз. Выявлено участие фосфатидилхолина, фосфатидилсерина, фосфатидилинозитола, фосфатидилэтаноламина, кардиолипина, свободных жирных кислот и диглицеридов в динамике адаптации тимоцитов к искусственному гипобиозу.

Авторы выражают глубокую благодарность Дмитрию Александровичу Игнатьеву за обучение методу «закрытого сосуда» и помощь в работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 09-04-00993-а).

Список литературы

1. Майстрах Е.В. Гипотермия и анабиоз. М.–Л.: Наука, 1964. 327 с.
2. Игнатьев Д.А., Фиалковская Л.А., Перепелкина Н.И., Маркевич Л.Н. и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2006. Т. 46. № 6. С. 705–712.

3. Edwards S.L. Uses of therapeutic hypothermia // Prof. Nurse. 1999. V. 14. № 6. P. 405–409.
4. Liu L., Yenari M.A. Clinical application of therapeutic hypothermia in stroke // Neurol. Res. 2009. V. 31. № 4. P. 331–335.
5. Marion D., Bullock M.R. Current and future role of therapeutic hypothermia // J. Neurotrauma. 2009. V. 26. № 3. P. 455–467.
6. Turk E.E. Hypothermia // Forensic. Sci. Med. Pathol. 2010. V. 6. № 2. P. 106–115.
7. Тимофеев Н.Н. Гипобиоз и криобиоз. Прошлое, настоящее, будущее. М.: Информ-Знание, 2005. 256 с.
8. Игнатьев Д.А., Воробьев В.В., Сухова Г.С., Зиганшин Р.Х. и др. Зимняя спячка и искусственный гипобиоз (изучение нейробиохимических факторов гibernации) // Нейробиохимия. 1998. Т. 15. № 3. С. 240–263.
9. Гурин В.Н. Обмен липидов при гипотермии, гипертермии и лихорадке. Минск: Беларусь, 1986. 190 с.
10. Aloia R.C., Raison I.K. Membrane function in mammalian hibernation // Biochim. Biophys. Acta. 1989. V. 988. P. 123–146.
11. Dark J. Annual lipid cycles in hibernators: integration of physiology and behavior // Annu. Rev. Nutr. 2005. V. 25. P. 469–497.
12. Brown D.A., London E. Functions of lipid rafts in biological membranes // Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 1998. V. 14. P. 111–136.
13. Alessenko A.V., Burlakova E.B. Functional role of phospholipids in the nuclear events // Bioelectrochemistry. 2002. V. 58. № 1. P. 13–21.
14. Albi E., Lazzarini R., Magni M.V. Phosphatidylcholine/sphingomyelin metabolism crosstalk inside the nucleus // Biochem. J. 2008. V. 410. № 2. P. 381–389.
15. Ярилин А.А. Иммунология. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с.
16. Egerton M., Scollay R., Shortman K. Kinetics of mature T-cell development in the thymus // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 7. P. 2579–2582.
17. Kolomiitseva I.K., Kulagina T.P., Markevich L.N., Arkhipov V.I. et al. Nuclear and chromatin lipids: metabolism in normal and gamma-irradiated rats // Bioelectrochemistry. 2002. V. 58. № 1. P. 31–39.
18. Регламентация работы с лабораторными животными / Под ред. А.А. Кудрявцевой. Пущино: АН СССР, 1983. 8 с.
19. Кулагина Т.П., Шурута С.С., Коломийцева И.К. Метаболизм нейтральных липидов ядер и хроматина тимоцитов крыс в норме и после γ -облучения // Биохимия. 1993. Т. 58. № 2. С. 295–299.
20. Коломийцева И.К., Маркевич Л.Н., Игнатьев Д.А., Быкова О.В. Липиды ядерных фракций нейронов и глии неокортекса при искусственном гипобиозе крыс // Биохимия. 2010. Т. 75. № 9. С. 1265–1272.
21. Nohturfft A., Zhang S.C. Coordination of lipid metabolism in membrane biogenesis // Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 2009. V. 25. P. 539–566.
22. Flores I., Jones D.R., Mérida I. Changes in the balance between mitogenic and antimitogenic lipid second messengers during proliferation, cell arrest, and apoptosis in T-lymphocytes // FASEB J. 2000. V. 14. № 13. P. 1873–1875.

23. Стручков В.А., Стражевская Н.Б. ДНК-связанные липиды: состав и возможные функции // Биохимия. 1993. Т. 58. № 8. С. 1154–1175.

24. Аксёнова Г.Е., Логвинович О.С., Фиалковская Л.А., Афанасьев В.Н. и др. // Биохимия. 2010. Т. 75. Вып. 9. С. 1257–1264.

25. Милейковская Е., Жанг М., Доухан В. Роль кардиолипина в энергозапасяющих мембранах // Биохимия. 2005. Т. 70. № 2. С. 191–196.

26. Chicco A.J., Sparagna G.C. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2007. V. 292. №. 1. P. C33–C44.

EFFECT OF ARTIFICIAL HYPOBIOSIS ON THE AMOUNT OF LIPIDS IN RAT THYMOCYTES

O.V. Bykova, L.N. Markevich, I.K. Kolomiytseva

The effect of artificial hypobiosis on the amount of phospholipids and neutral lipids in thymocytes was studied in rats under conditions of hypothermia-hypercapnia. For the first time, cardiolipin has been shown to participate in the adaptive responses of thymocytes to the state of artificial hypobiosis. We have also demonstrated an adaptive role of fatty acids, diglycerides and phospholipids in the metabolic response of thymocytes to artificial hypobiosis in rats.

Keywords: thymocytes, artificial hypobiosis, phospholipids, neutral lipids.