

Н.А. Бабенко, В.С. Куликова

Роль церамида в регуляции активности фосфолипазы Д и модуляции состояния инсулинорезистентности

Отдел физиологии онтогенеза НИИ биологии Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина

Ключевые слова: церамид • фосфолипаза Д • инсулинорезистентность

Известно, что инсулин, взаимодействуя с рецепторами плазматической мембраны, вызывает быструю фосфатидилинозитол-3-киназа (ФИЗК)-зависимую активацию ФХ-специфичной фосфолипазы Д (ФЛД), накопление диацилглицерола (ДАГ), активацию протеинкиназы С (ПКС), автофосфорилирование β -субъединиц рецепторов инсулина и терминацию передачи гормонального сигнала. ФЛД является позитивным модулятором процесса транспорта глюкозы в стимулированных инсулином клетках. Развитие инсулинорезистентности тесно связано с накоплением в тканях-мишенях, не приспособленных для запаса жира, метаболитов липидов, таких как ДАГ и церамид. Они способны ингибировать сигнальную трансдукцию и приводить к клеточной дисфункции и/или клеточной гибели. Повышение содержания ДАГ приводит к нарушению автофосфорилирования ПКЗой С рецепторных β -субъединиц, снижению активности ФИЗК. ДАГ может активировать сфингомиелиназы и провоцировать образование церамида, ингибитора ФЛД. Кроме того, церамид ингибирует активацию инсулином протеинкиназы В (ПКВ), которая необходима для регуляции стимулированного гормоном метаболизма глюкозы во всех тканях-мишенях.

Цель работы – изучение влияния инсулина на активность ФЛД, и на обмен сигнальных липидов в ткани диафрагмы 3-месячных крыс в условиях моделирования состояния резистентности.

Методы. Исследования проводили на 3-месячных самцах крыс линии Вистар. Животные контрольной группы, содержались на стандартном рационе вивария. В опытной группе в течение 4-х недель калорийность рациона была увеличена на 21% за счет добавления к стандартной диете говяжьего жира (в качестве источника насыщенных жиров). Диафрагму инкубировали на протяжении 90 минут в буфере Кребс-Хенселейта в присутствии [^{14}C]H₃COONa (10 мкКи/мл) (в качестве предшественника липидов). Для моделирования состояния резистентности *in vitro* диафрагму интактных 3-месячных крыс инкубировали в течение 6 часов в присутствии [^{14}C]H₃COONa (10 мкКи/мл), С₂-церамида (10 мкг/мл) или пальмитиновой кислоты (0,75 мМ). Для определения содержания фосфатидилэтанола (ФЭТ) (специфического продукта реакции, катализируемой ФЛД) диафрагму перед добавлением гормона прединкубировали 10 минут с 300 мМ этанолом. Определяли индуцированные инсулином поглощенные [^3H]-D-глюкозы клетками и включение [U- ^{14}C]-D-глюкозы в гликоген. Разделение отдельных липидов проводили методом тонкослойной хроматографии. Радиоактивность образцов определяли с помощью счетчика радиоактивности БЕТА. Для сравнения данных ис-

пользовали многофакторный дисперсионный анализ и t-критерий Стьюдента.

Результаты. Установлено, что инкубация диафрагмы интактных 3-месячных крыс с инсулином в течение 5 минут приводила к снижению на 23% содержания [^{14}C]фосфатидилхолина ([^{14}C]ФХ), что сопровождалось повышением содержания [^{14}C]ФЭТ на 22%. Указанные изменения содержания липидов свидетельствуют об активации инсулином ФХ-специфичной ФЛД у молодых животных в этот промежуток времени.

Высокое содержание насыщенных ЖК в рационе молодых крыс привело к повышению содержания [^{14}C]ДАГ, [^{14}C]триацилглицерола, [^{14}C]свободных жирных кислот и [^{14}C]церамида и снижению содержания [^{14}C]сфингомиелина в диафрагме. Кроме того, инсулин не вызвал изменений в содержании [^{14}C]ФХ и [^{14}C]ФЭТ в диафрагме.

Известно, что церамид является ингибитором ФЛД, которая принимает участие в каскаде сигналинга инсулина. Установлено, что длительная инкубация диафрагмы 3-месячных интактных крыс с экзогенным С₂-церамидом привела к снижению содержания [^{14}C]ФХ. Кроме того, С₂-церамид ингибировал стимулированный инсулином транспорт [^3H]-D-глюкозы и синтез [^{14}C]гликогена. В диафрагме, инкубированной с экзогенным С₂-церамидом, в ответ на действие инсулина не наблюдалось изменений [^{14}C]ФХ и [^{14}C]ФЭТ, что свидетельствует о подавлении стимуляции гормоном ФЛД.

Инкубация кусочков диафрагмы с экзогенной пальмитиновой кислотой приводила к снижению содержания [^{14}C]ФХ и подавлению стимулированного инсулином синтеза гликогена. При действии инсулина на ткань происходило снижение содержания [^{14}C]ФХ на 25%, однако, повышения содержания [^{14}C]ФЭТ в этих условиях эксперимента не наблюдалось. Можно предположить, что в данном случае происходило подавление синтеза ФХ церамидом, уровень которого увеличивался в диафрагме в условиях прединкубации с пальмитиновой кислотой.

Таким образом, установлено, что в диафрагме интактных 3-месячных крыс инсулин вызывает быструю активацию ФЛД. При высоком содержании насыщенных жирных кислот в рационе молодых животных, или внесении в среду инкубации диафрагмы экзогенного церамида или его предшественника - пальмитиновой кислоты происходит отмена активации ФЛД инсулином, вероятно в результате ингибирования фермента церамидом. Полученные данные свидетельствуют о том, что увеличение базального уровня церамида в клетках может нарушать инсулиновый сигналинг не только за счет ингибирования Акт/ПКВ, но и за счет блокирования ФЛД/ДАГ/ПКС-зависимого звена.