

РОЛЬ КИСЛОЙ СФИНГОМИЕЛИНАЗЫ В НАРУШЕНИИ ИНСУЛИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ПОГЛОЩЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ МЫШЕЧНОЙ ТКАНЬЮ В СТАРОСТИ

Бабенко Н. А., Тимофийчук О. А.

*НИИ биологии Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина
babenko@univer.kharkov.ua*

Многочисленными исследованиями [1, 2] установлено подавление метаболизма глюкозы у пациентов с депрессивными психическими расстройствами. Установлена положительная связь между развитием депрессии, ожирением и состоянием инсулинорезистентности, которые, в свою очередь, являются факторами риска развития сахарного диабета (СД) 2 типа [2]. Биологические механизмы, лежащие в основе развития инсулинорезистентности на фоне депрессивного состояния, на данный момент изучены недостаточно. Однако полагают, что они реализуются через гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему, серотониновую систему и систему провоспалительных цитокинов [3]. Полагают, что такие провоспалительные сигнальные молекулы, как интерлейнины 1β и 6 (IL- 1β , IL-6), С-реактивный белок (CRP) и фактор некроза опухолей (TNF- α), содержание которых значительно возрастает при депрессивных расстройствах, могут индуцировать нарушения в звеньях сигналинга инсулина, вовлеченных в регуляцию стимулированного гормоном поглощения и метаболизма глюкозы в тканях-мишенях [3, 4]. Так, TNF- α в скелетной мышечной ткани подавляет фосфорилирование белков IRS-1 по остаткам тирозина, что снижает спо-

собность IRS-1 присоединять р85-регуляторную субъединицу фосфатидилинозитол-3-киназы (ФИЗК) и ингибирует активацию протеинкиназы В/Akt через р38 MAPK-зависимый сигнальный путь [4]. Некоторые ученые считают, что трициклические антидепрессанты, такие как имипрамин (мелипрамин, дезипрамин) и амитриптилин, являются эффективными модуляторами продукции цитокинов и инсулин-индуцированного поглощения глюкозы на фоне депрессивного психического расстройства [5].

Недавними исследованиями было показано, что характерным признаком депрессивных состояний, ожирения, СД 2 типа и ряда других возрастных патологий является значительное повышение активности кислой сфингомиелиназы (кСФМазы). Так, J. Kornhuber и соавт. [6] обнаружили повышение активности кСФМазы в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов с депрессивными психическими расстройствами, а F. Samad [7] показал чрезмерную экспрессию генов кСФМазы в адипозных тканях ob/ob мышей.

кСФМаза — фермент, катализирующий гидролиз мембранного сфингомиелина (СФМ) с образованием церамида. Следует отметить, что сфинголипиды (СФЛ) — СФМ и его метаболит церамид являются

не только структурообразующими липидами мембран, но и важными медиаторами клеточных сигналов в процессах пролиферации, дифференциации и роста клеток, воспаления, онкогенеза и старения. Полагают, что смещение баланса в обмене СФЛ в сторону накопления церамида, вследствие сверхактивации кСФМазы, может приводить к развитию инсулинорезистентности и СД 2 типа. Установлено, что экзогенный С₂- и С₆-церамид индуцируют развитие инсулинорезистентности в С2С12 и L6 миотрубочках [8]. Прединкубация диафрагмы молодых 3-месячных крыс в присутствии С₂-церамида или предшественника синтеза церамидов — пальмитиновой кислоты приводила к увеличению в ткани уровня эндогенного церамида и существенному подавлению индукции инсулином транспорта глюкозы и синтеза гликогена [9]. Полагают, что накопление церамида в клетках приводит к нарушению сигналинга инсулина через ингибирование ФИЗК, протеинкиназы В/Акт и активацию протеинфосфатазы 2А [8].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на семи самцах крыс линии Вистар 3-месячного возраста весом около 200 г (группа 1) и на 17 крысах 24-месячного возраста весом около 480 г, содержащихся в стандартных условиях вивария НИИ биологии ХНУ.

Животные 24-месячного возраста были разделены на следующие группы:

группа 2 — крысы, не подвергавшиеся воздействию;

группа 3 — крысы, получавшие в/м инъекцию 0,9% NaCl — контрольные животные;

группа 4 — крысы, получавшие в/м инъекцию мелипрамина (имипрамин, EGIS, Венгрия; 10 мг/кг веса животного, 14 суток) — подопытные животные.

Животных декапитировали под диэтиловым эфирным наркозом. С задних конечностей извлекали длинный разгибатель пальцев (ДРП), с которого удаляли видимый жир. После этого в эксперименте *in vivo* ткани замораживали в жидком азоте и гомогенизировали. В эксперименте *in vitro* также был использован ДРП

R. W. Jenkins и соавторы [10] на клетках MCF7 продемонстрировали дозозависимое подавление активности кСФМазы имипрамином в экспериментах как *in vivo*, так и *in vitro*. Установлено также, что длительное введение старым 24-месячным крысам мелипрамина сопровождается существенным повышением в печени, сердце, неокортексе и гиппокампе содержания СФМ и снижением соотношения церамид/СФМ по сравнению с контрольными животными [11]. Учитывая вышесказанное, можно предположить возможность коррекции при помощи данного препарата возрастных нарушений обмена СФЛ, а также улучшения рецепции и реализации инсулиновых сигналов в скелетной мускулатуре. Ввиду этого целью нашего исследования было изучение возможности коррекции нарушения инсулин-индуцированного поглощения глюкозы скелетной мышечной тканью старых крыс путем ингибирования кислой сфингомиелитазы при помощи имипрамина.

24-месячных крыс. В среду инкубации ДРП (Кребс/бикарбонатный буфер; 37 °С, рН 7,5) добавляли Н₂О (группа 5) или имипрамин (Sigma-Aldrich, Германия) в концентрациях 50 мкМ (группа 6) и 100 мкМ (группа 7).

По истечении 2 ч инкубации одну из мышц каждой пары стимулировали инсулином (100 нМ), а другую — 0,9% NaCl. Через 30 минут инкубации добавляли [³H]-D-глюкозу (0,5 мкКи/мл; 10 мин). После включения метки ткань отмывали 0,9% NaCl и лизировали в 1 N NaOH (10 мин; 80 °С). Радиоактивность меченой [³H]-D-глюкозы определяли с помощью счетчика радиоактивности БЕТА. Экстракцию липидов из тканей выполняли методом E. G. Bligh и W. J. Dyer [12]. Фракционирование индивидуальных представителей липидов проводили методом одномерной восходящей хроматографии в тонком слое силикагеля (пластины Sorbfil, АО «Сорбполимер», Россия) в системе растворителей: диэтиловый эфир — система 1 и хлороформ:метанол:вода (40:10:1, об/об) — си-

стема 2. Пятна липидов проявляли в парах йода і ідентифікували, порівнюючи з стандартами [13]. Кількісне визначення вмісту ліпидів в пробах проводили за методом, описаним нами раніше [14]. Вміст білка визначали методом О. Н. Lowry і соавт. [15].

Внаслідок перевірки розподілу даних за відповідності нормальному закону, для порівняння даних вмісту ліпидів кон-

трольної і підопитної груп були використані параметричний однофакторний дисперсійний аналіз one-way Anova і t-критерій Стюдента. Дані представлені як середнє арифметичне і статистична помилка середнього арифметичного ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$). Різниця між групами вважали статистично значимими при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ І ЇХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, що інсулін надає суттєве стимулююче вплив на поглинання $[^3\text{H}]\text{-D}$ -глюкози м'язової тканини ДРП молодих 3-місячних тварин і в значно меншій ступені — тканини 24-місячних крыс (см. табл.).

Ураховуючи те, що накоплення керамідів в клітках-мишенях призводить до зниження аутофосфорильованих рецепторних β -суб'єдиниць, порушенню активації ФІЗК, фосфоліпази D і протеїнкінази B/Akt інсуліном і інгібуванню транслокації інсулін-чутливих транспортерів глюкози GLUT-4 в плазматичну мембрану [8], можна передбачити, що накоплення керамідів в тканинах в старості є однією з причин порушення сигналізації гормону.

Настоящим дослідженням встановлено, що в процесі фізіологічного старіння відбувається накоплення ендogenous керамідів в ДРП крыс (рис., А). Зниження ба-

зального рівня СФМ в скелетній м'язовій тканині старих крыс (на 48% порівняно з молодими 3-місячними тваринами) (рис., Б) може свідчити про те, що активація СФМаз в старості є важливою причиною накоплення керамідів в м'язовій тканині.

В користь даного припущення свідчать установлені нами підвищення співвідношення керамідів/СФМ в ДРП крыс 24-місячного віку (на 224% порівняно з молодими тваринами) (рис., В), а також результати досліджень, проведених в різних органах і тканинах і показавших суттєву активацію кСФМазы в процесі старіння [11, 16]. Висказано припущення, що кСФМазе належить важлива роль в розвитку асоційованого з віком порушення балансу СФЛ.

Порушення нормального співвідношення керамідів/СФМ в клітках м'язової тканини на фоні підвищеної активності СФМазы

Т а б л и ц а

Влияние имиπραмина на регуляцию инсулином поглощения $[^3\text{H}]\text{-D}$ -глюкозы скелетной мышечной тканию

Возраст, воздействие	Поглощение $[^3\text{H}]\text{-D}$ -глюкозы, % от базального поглощения
3-месячные	215 ± 12,8*
24-месячные	111 ± 5,87
24-месячные (H ₂ O <i>in vitro</i>)	112 ± 3,32
24-месячные, имипрамин (50 мкМ <i>in vitro</i>)	141 ± 12,2
24-месячные, имипрамин (100 мкМ <i>in vitro</i>)	301 ± 9,31*

Примечание. * — $p < 0,05$ в сравнении с базальным поглощением $[^3\text{H}]\text{-D}$ -глюкозы.

может приводить к развитию таких метаболических расстройств, как инсулинорезистентность и СД 2 типа. F. Samad и соавт. [7] обнаружили, что повышение активности кСФМазы индуцируется про-воспалительными цитокинами, например TNF- α , в адипозной ткани кроликов, страдающих ожирением. Интересен тот факт, что у людей с синдромом Нимана-Пика 1 типа, при котором значительно снижается активность кСФМазы, и у кСФМаза-knockout мышей, содержащихся на обогащенной жирами диете, не наблюдается развитие инсулинорезистентности [17]. Кроме того, было показано, что инкубация клеток гепатомы (Faо) с экзогенными кСФМазой или керамидом сопровождается фосфорилированием и, таким образом, негативной модуляцией IRS-1, что приводит к ингибированию сигналинга инсулина [18]

С целью коррекции содержания СФЛ и соотношения керамид/СФМ нами был использован специфический ингибитор

кСФМазы, трициклический антидепрессант — имипрамин [6, 11]. Продолжительное введение имипрамина старым крысам в условиях *in vivo* индуцировало снижение содержания керамидов на 46 % (рис. 1.А) и повышение базального уровня СФМ на 92 % (рис. 1.Б) в ДРП 24-месячных крыс по сравнению с контрольной группой. Таким образом, снижение соотношения керамид/СФМ на 71 % в ДРП старых крыс по сравнению с контролем (рис., В) может свидетельствовать о подавлении СФМазной активности.

Существует предположение, что имипрамин ингибирует активность кСФМазы через нарушение ее связи с отрицательно заряженными липидами лизосомальных мембран, после чего СФМаза подвергается протеолизу. Также известно, что введение здоровым животным имипрамина и аналогичных ему антидепрессантов — блокаторов кСФМазы может имитировать эффекты, которые наблюдаются у животных с генети-

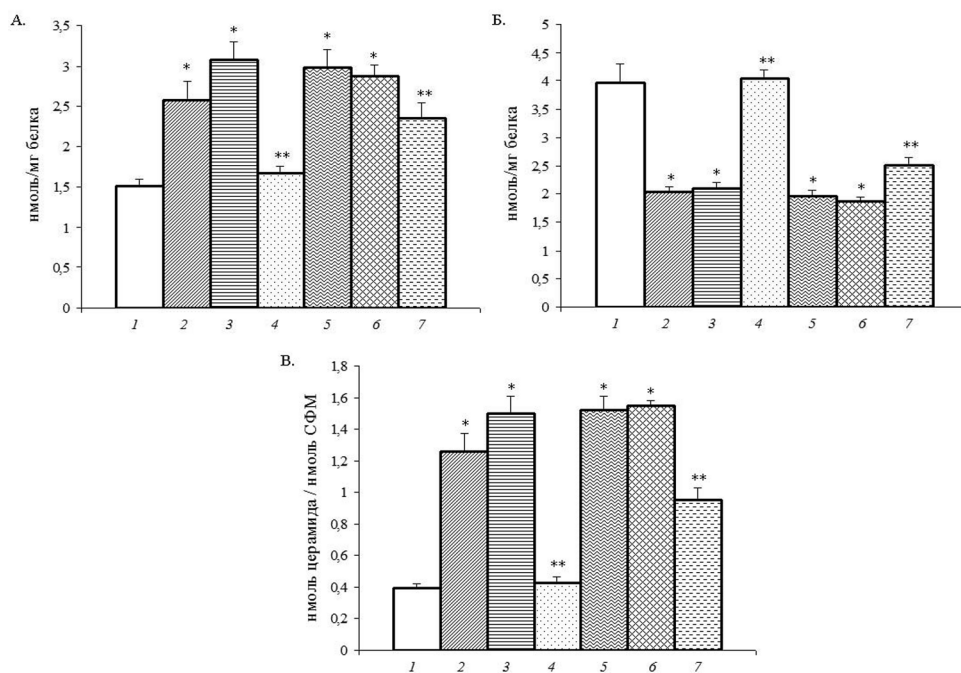


Рис. Влияние имипрамина на содержание керамидов (А), СФМ (Б) и соотношение керамид/СФМ (В) в мышечной ткани.

На оси абсцисс: 1 — 3-месячные крысы; 2 — 24-месячные крысы; 3 — 24-месячные крысы, контроль (0,9% NaCl *in vivo*); 4 — 24-месячные крысы, имипрамин *in vivo*; 5 — 24-месячные крысы, контроль (H₂O *in vitro*); 6 — 24-месячные крысы, 50 мкМ имипрамин *in vitro*; 7 — 24-месячные крысы, 100 мкМ имипрамин *in vitro*.

* — $p < 0,05$ по сравнению с 3-месячными крысами;
 ** — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

чески обусловленным ее отсутствием [10]. Кроме того, настоящим исследованием было показано, что в результате инкубации ДРП 24-месячных крыс с имипрамином в концентрации 50 мкМ в условиях *in vitro* не происходят значимые изменения в содержании СФЛ (см. рис.) по отношению к контролю. В то же время инкубация скелетной мышцы старых крыс с имипрамином в концентрации 100 мкМ индуцировала изменение баланса церамид/СФМ в сторону снижения массы церамида (на 21 % по сравнению с контролем), что может свидетельствовать об эффективности имипрамина как модулятора содержания СФЛ в мышечной ткани в условиях *in vitro*. Снижение уровня церамида относительно СФМ может свидетельствовать о том, что как длительное введение имипрамина, так и кратковременное воздействие препарата на мышечную ткань успешно ингибировало активность кСФМазы в ДРП старых крыс.

Учитывая то, что ингибитор кСФМазы имипрамин снижает соотношение церамид/СФМ в ДРП старых крыс до уровня, наблюдающегося у молодых животных, можно предположить, что возрастные изменения содержания СФЛ являются обратимыми и во многом определяются сверхактивацией кСФМазы.

ВЫВОДЫ

1. В скелетной мышечной ткани крыс 24-месячного возраста наблюдается накопление церамида, снижение базального уровня сфингомиелина и рост соотношения церамид/сфингомиелин по сравнению с молодыми 3-месячными животными.
2. Имипрамин является эффективным регулятором содержания сфинголипидов в мышечной ткани старых животных как в условиях *in vivo*, так и *in vitro*. Действие препарата может быть

Нами установлено, что после прединкубации ДРП старых крыс с 50 мкМ имипрамином наблюдается тенденция к увеличению индуцированного инсулином поглощения глюкозы мышечной тканью (см. табл.). В то же время, введение инсулина в Кребс/бикарбонатный буфер после инкубации ДРП с 100 мкМ имипрамином индуцировало повышение поглощения [³H]-D-глюкозы мышечной тканью на 169 % по сравнению с контролем. Вероятно, что стимулированное инсулином поглощение глюкозы коррелирует с ингибирующим действием имипрамина на активность кСФМазы и, как результат, с восстановлением сфинголипидного баланса в скелетной мышечной ткани старых животных. Учитывая то, что кСФМаза играет важную роль в реализации эффектов провоспалительных цитокинов [7, 19, 20], продукция которых увеличивается в клетках в процессе старения и развития резистентности к влиянию инсулина, можно полагать, что индуцированное цитокинами нарушение баланса между СФМ и церамидом опосредовано активацией кСФМазы и может являться важной причиной развития инсулинорезистентности в старости.

связано с его способностью подавлять активность кислой сфингомиелиназы и является дозозависимым.

3. Имипрамин усиливает индукцию инсулином поглощения глюкозы в длинном разгибателе пальцев старых животных, что свидетельствует об увеличении чувствительности скелетной мышечной ткани крыс к действию инсулина, вероятно, путем специфического ингибирования кислой сфингомиелиназы.

ЛІТЕРАТУРА
(REFERENCES)

1. Rustad JK, Musselman DL, Nemeroff CB. *Psychoneuroendocrinology* 2011; 36:1276-1286.
2. Wagner J, Allen NA, Swalley LM, et al. *Diabetes Res Clin Pract* 2009; 86(2):96-103.
3. Wieser V, Moschen AR, Tilg H. *Arch Immunol Ther Exp* 2013; 61(2):119-125.
4. Wei Y, Chen K, Whaley-Connell AT, et al. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 294:R673-R680.
5. Chen YC, Lin WW, Chen YJ, et al. *Mediators Inflammation* 2010. doi: 10.1155/2010/573594.
6. Kornhuber J, Medlin A, Bleich S, et al. *J Neural Transm* 2005; 112:1583-1590.
7. Samad F, Hester KD, Yang G, et al. *J Diabetes* 2006; 55:2579-2587.
8. Gorski J. *Diabetes* 2012; 61:3081-3083.
9. Babenko NA, Harchenko VS. *Problemy endokrynnoi' patologii'* 2009; 1:37-43.
10. Jenkins RW, Canals D, Idkowiak-Baldys J, et al. *Ibid* 2010; 285(46):35706-35718.
11. Garkavenko VV, Storozhenko GV, Krasnikova ON, Babenko NA. *Inter J Physiol Pathophysiol* 2012; 3(3):281-286.
12. Bligh EG, Dyer WJ. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37(8):911-917.
13. Findlej DB. *Biologicheskie membrany. Metody, Moskva*, 1990:424 p.
14. Babenko NA, Kharchenko VS. *Biochemistry (Moscow)* 2012; 77(2):180-186.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. *J Biol Chem* 1951; 193:365-375.
16. Babenko N, Shakhova E. *Experim Gerontol* 2006; 41(1):32-39.
17. Deevska GM, Rozenova KA, Giltiy NV, et al. *J Biol Chem* 2009; 284(13):8359-8368.
18. Herschkovitz A, Liu YF, Ilan E, et al. *J Biol Chem* 2007; 282(25):18018-18027.
19. Hofmeister R, Wiegmann K, Korherr C, et al. *J Biol Chem* 1997; 272:27730-27736.
20. Henkes LE, Sullivan BT, Lynch MP, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(22):7670-7675.

РОЛЬ КИСЛОЇ СФІНГОМІЕЛІНАЗИ У ПОРУШЕННІ ІНСУЛІН-ІНДУКОВАНОГО ПОГЛИНАННЯ ГЛЮКОЗИ М'ЯЗОВОЮ ТКАНИНОЮ У СТАРОСТІ

Бабенко Н. О., Тимофійчук О. О.

НДІ біології Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна
babenko@univer.kharkov.ua

Досліджено можливість корекції порушення інсулін-індукованого поглинання глюкози м'язовою тканиною старих щурів шляхом інгібування кислій сфінгомелінази (кСФМази) за допомогою іміпраміну. Встановлено, що в м'язовій тканині 24-місячних щурів відбувається накопичення кераміду, зниження маси сфінгомеліну (СФМ) та зростання співвідношення керамід/СФМ у порівнянні з 3-місячними щурами. Уведення іміпраміну старим тваринам, як і додавання препарату до інкубаційного середовища довгого розгинача пальців, індукує зниження рівня кераміду, накопичення СФМ та зниження співвідношення керамід/СФМ у порівнянні з контролем, що може бути обумовленим здатністю препарату пригнічувати активність кСФМази. Дія іміпраміну в умовах *in vitro* супроводжується покращенням інсулін-індукованого поглинання глюкози м'язовою тканиною старих щурів. Висловлюється припущення, що кСФМазі належить важлива роль у модуляції інсулінового сигнального каскаду у тканинах-мішенях у старості через продукцію кераміду.

К л ю ч о в і с л о в а : керамід, кислота сфінгомеліназа, іміпрамін, інсулінорезистентність, старіння.

РОЛЬ КИСЛОЙ СФИНГОМИЕЛИНАЗЫ В НАРУШЕНИИ ИНСУЛИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ПОГЛОЩЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ МЫШЕЧНОЙ ТКАНЬЮ В СТАРОСТИ

Бабенко Н. О., Тимофийчук О. А.

НИИ биологии Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина
babenko@univer.kharkov.ua

Изучена возможность коррекции нарушения инсулин-индуцированного поглощения глюкозы мышечной тканью старых крыс путем ингибирования кислой сфингомиелиназы (кСФМазы) при помощи имипрамина. Установлено, что в мышечной ткани 24-месячных крыс происходит накопление церамида, снижение массы сфингомиелина (СФМ) и рост соотношения церамид/СФМ по сравнению с 3-месячными крысами. Введение имипрамина старым животным, как и внесение препарата в среду инкубации длинного разгибателя пальцев, индуцирует снижение уровня церамида, накопление СФМ и падение соотношения церамид/СФМ по сравнению с контролем, что может быть обусловлено способностью препарата подавлять активность кСФМазы. Действие имипрамина *in vitro* сопровождается улучшением инсулин-индуцированного поглощения глюкозы мышечной тканью старых крыс. Высказывается предположение, что кСФМазе принадлежит важная роль в модуляции сигналинга инсулина в тканях-мишенях в старости через продукцию церамида.

К л ю ч е в ы е с л о в а: церамид, кислая сфингомиелиназа, имипрамин, инсулинорезистентность, старение.

THE ROLE OF ACID SPHINGOMYELINASE IN INSULIN-INDUCED GLUCOSE UPTAKE VIOLATIONS BY MUSCLE TISSUE IN OLD AGE

N. A. Babenko, O. A. Timofiychuk

Institute of Biology, V. Karazin Kharkiv National University
babenko@univer.kharkov.ua

It was study the possibility of correction of violations of the insulin-induced glucose uptake by muscle tissue of older rats by inhibiting acid sphingomyelinase (aSMase) with imipramine. Found that in muscle tissue 24-month-old rats, there are an accumulation of ceramide, weight sphingomyelin (SM) and the growth of the ratio of ceramide/SM compared to 3-month-old rats. The introduction of imipramine old animal, like the introduction of the drug in the incubation medium of the extensor digitorum longus, induces a decrease in the level of ceramide accumulation of SM and drops of the ratio of ceramide/SM compared with the control, which may be due to the ability of the drug to inhibit the activity of aSMase. Effect of imipramine *in vitro* accompanied by improved insulin-induced glucose uptake by muscle tissue of old rats. It is suggested that aSMase does an important role in the modulation of insulin signaling in target tissues in old age through the production of ceramide.

K e y w o r d s: ceramide, acid sphingomyelinase, imipramine, insulin resistance, aging.