УДК 577.115:612.35

© Н.А. Бабенко, А.Н. Белый, В.С. Харченко, 2013.

РОЛЬ ЦЕРАМИДОВ С РАЗЛИЧНОЙ ДЛИНОЙ АЦИЛЬНОЙ ЦЕПИ В НАРУШЕНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ

Н.А. Бабенко, А.Н. Белый, В.С. Харченко

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, отдел физиологии онтогенеза НИИ биологии, г. Харьков.

DIFFERENT CERAMIDE ANALOGS INDUCE THE LIVER CELL MALFUNCTION

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

SUMMARY

In the present work effects of exogenous ceramides with different acyl chain length on the liver cells function has been studied. Incubation of hepatocytes in the presence of C16- or C18-ceramide is accompanied by the increase of the level of ceramides in cells and this effect depends on the amount of exogenous ceramides in the culture medium. The cell permeable C2-ceramide does not change the endogenous long-chain ceramides contents in hepatocytes in the present experimental condition. C2-, C16- and C18-ceramides do not cause the significant change of viability of hepatocytes in present experimental condition. Applied ceramides practically do not affect on permeability of cell plasma membranes. Incubation of the isolated hepatocytes in the presence of exogenous ceramides significantly represses the synthesis of general lipids and glycerophospholipids: phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. C2-ceramide addition to the culture medium reduces the fetal serum- or insulin-induced phospholipase D activity markers ([14C]phosphatidic acid and [14C]phosphatidylethanol) accumulation. At the same time, C16- and C18-ceramide do not change the PLD activity induced by growth factors and insulin in the isolated hepatocytes. Thus, the obtained data show that ceramides, regardless of their structural features, are the important regulators of lipid homeostasis in the liver cell. At the same time, effect of exogenous ceramides on growth factors and insulin signaling in the liver cells depends on the type of ceramide acyl residues.

РОЛЬ ЦЕРАМІДІВ ІЗ РІЗНОЮ ДОВЖИНОЮ АЦИЛЬНОГО ЛАНЦЮГА В ПОРУШЕННІ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ КЛІТИН ПЕЧІНКИ

Н.О. Бабенко, О.М. Білий, В.С. Харченко

РЕЗЮМЕ

В даній роботі вивчали вплив екзогенних церамідів из різною довжиною ацильного ланцюга на функціональний стан клітин печінки. Інкубація гепатоцитів у присутності С16- або С18-цераміду супроводжується підвищенням рівня церамідів в клітинах і цей ефект залежить від кількості екзогенних церамідів в середовищі культивування. С2-церамід не викликає збільшення вмісту ендогенних довго ланцюгових церамідів в гепатоцитах. С2-, С16-, С18-цераміди не призводять до значних змінень життєздатності гепатоцитів. Інкубація ізольованих гепатоцитів у присутності екзогенних церамідів значно пригнічує синтез загальних ліпідів і гліцерофосфоліпідів. Додавання в середовище культивування С2-цераміду зменшує індуковане ембріональною сироваткою або інсуліном вивільнення [^{14}C]фосфатидної кислоти та утворення [^{14}C]фосфатидилетанолу, що говорить про пригнічення активності фосфоліпази Д в клітинах печінки. С16- и С18-церамід не змінювали активність фосфоліпази Д, індукованої факторами роста і інсуліном в ізольованих гепатоцитах. Таким чином, отримані дані вказують на те, що цераміди є важливими модуляторами обміну ліпідів в клітинах печінки. Дія екзогенних церамідів на стимуляцію ростовими факторами і інсуліном активності фосфоліпази Д в клітинах печінки залежить від типу їхнього ацильного ланцюга.

Ключевые слова: первичная артериальная гипертензия, факторы риска, дети.

Церамиды являются компонентами биологических мембран и участниками важнейших процессов протекающих в клетках: апоптозе, росте, автофагии и канцерогенезе. Церамиды накапливаются в клетках в процессе старения, развития нейро-дегенеративных заболеваний, инсулин-резистентности и диабета 2 типа [1, 2]. Длинно-цепочечные церамиды синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме при участии различных церамидсинтаз. Короткоцепочечные С2-, С6-церамиды, как правило, синтетические, легко проникают в клетки и широко используются для изучения роли церамидов в регуляции биологических процессов. Однако остается не решенным вопрос имитируют ли экзогенные церамиды физиологические эффекты эндогенных церамидов. Ряд исследований свидетельствуют о том, что биологические функции церамидов зависят от длины их жирнокислотных цепей. На клетках человека MDA435/LCC6 и макрофагах мыши J774 показано, что про-апоптозная активность церамида зависит от типа ацильного компонента [3]. На примере С6-, С8, С10-, С14- и С16-церамидов установлено, что их

цитотоксическое действие пропорционально длине ацильной цепи. Однако, доклинические и клинические исследования свидетельствуют о том, что синтезируемые de novo С16- и С18-церамиды могут играть различную роль в регуляции апоптоза в клетках и опухолях сквамозной карциномы головы и шеи [4]. Экспериментами in situ и in vivo установлено, что индукция синтеза в клетках С18-церамида при участии дигидроцерамидсинтазы (ДГЦС)1 активирует апоптоз, в то же время, генерируемый ДГЦС6 С16-церамид оказывает противоположный эффект и защищает опухолевые клетки карциномы от действия стресса [5]. Даун-регуляция гена кодирующего ДГЦС6 и продукцию С16-церамида индуцирует апоптоз клеток карциномы головы и шеи. Значительное снижение С24:0- и С24:1-церамидов на фоне почти 3-кратного повышения С14- и С16-церамидов происходит у ДГЦС2-нокаутных животных и клетках. В экспериментах in vivo эти изменения происходят параллельно активации апоптоза и пролиферации клеток печени, в конечном итоге приводящих к гепатомегалии и неинвазийной гепатокациноме [6].

В настоящей работе изучали влияние экзогенных церамидов с различной длиной ацильной цепи на функциональное состояние клеток печени и способность гепатоцитов адекватно отвечать на действие регуляторных факторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Свежевыделенные гепатоциты 3-месячных крыс-самцов линии Вистар ресуспендировали в среде Игла (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Россия), содержавшей 10% эмбриональную сыворотку (ООО «БиолоТ», Россия), 20 mM Hepes, пенициллин (61 мг/л), стрептомицин (100 мг/л), до $4 \cdot 10^7$ клеток/мл и инкубировали 4,5 часа при 37°С в присутствии [^{14}С]пальмитиновой кислоты (0,25 мкКи/мл) (Amersham, Англия), С2-церамида (D-эритро-N-ацетилсфингозин, (Amersham, Англия)) или С16-церамида (D-эритро-N-пальмитоилсфингозин) (Sigma, США) или С18-церамида (D-эритро-N-стеароилсфингозин) (Kaunas University of Technology, Lithuania), или контрольной смеси (додекан:этанол, 49:1, в эквивалентном объеме). Для определения активности ФЛД использовали метод, основанный на образовании фосфатидилэтанола (ФЭТ), фосфолипида, который образуется исключительно ФЛД через трансфосфатидилирование в присутствии этанола [7]. Экстракцию липидов и разделение отдельных липидов методом ТСХ на пластинках Sorbfil (АО "Сорбполимер", Россия), проводили по методу описанному ранее [8]. Пятна липидов проявляли в парах йода и идентифицировали, сравнивая со стандартами. Содержание фосфолипидов и церамидов определяли как описано ранее [8]. 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 И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Инкубация гепатоцитов в присутствии С16- или С18-церамида сопровождается повышением уровня церамидов в клетках и этот эффект зависит от количества экзогенных церамидов в культуральной среде (рис. 1А). В тоже время, С2-церамид, легко проникающий в клетки, не приводит к увеличению содержания эндогенных длинноцепочечных церамидов в гепатоцитах в данных условиях эксперимента. Применяемые в работе церамиды существенно подавляли синтез эндогенных церамидов из [^{14}С]пальмитиновой кислоты в клетках печени (рис. 1Б), что может носить адаптивный характер.

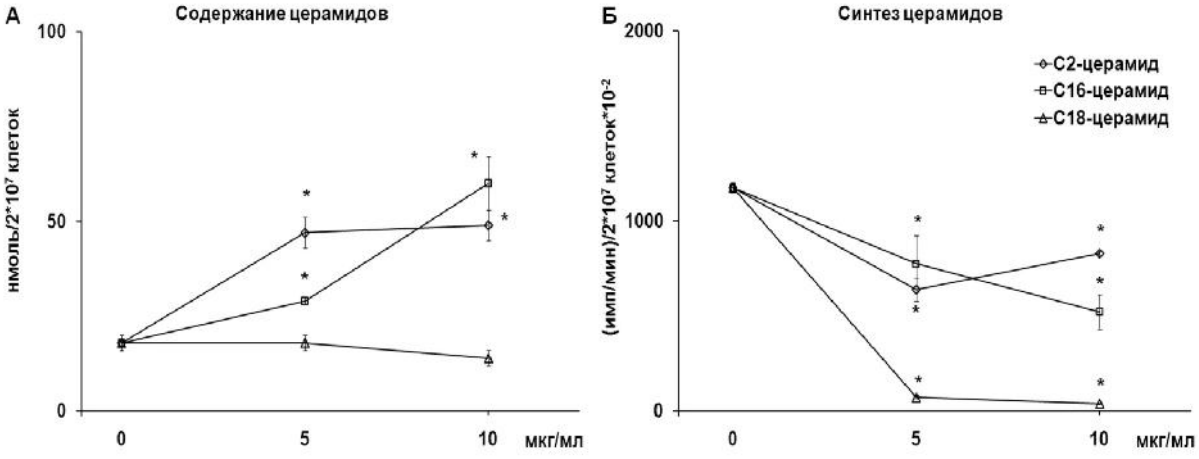

Рис. 1А.Б. Влияние экзогенных церамидов на содержание и синтез de novo церамидов в изолированных гепатоцитах 3-месячных крыс.

Примечание: * - статистически значимо по сравнению с контролем (смесь етанол:додекан 49:1), $p \leq 0,05$.

Учитывая то, что церамид является про-апоптозным липидом, подавление синтеза эндогенных церамидов в присутствии возрастающего количества экзогенных церамидов препятствует накоплению избыточного количества липида в клетках и их гибели.

В пользу данного предположения свидетельствуют данные о том, что С2-, С16- и С18-церамиды не приводят к существенному изменению жизнеспособности гепатоцитов в данных условиях эксперимента. Так, количество жизнеспособных клеток, измеряемого по проникновению в клетки трипанового синего, варьирует от 96 до 90% от общего количества гепатоцитов в контрольных и опытных пробах.

Однако, несмотря на то, что применяемые церамиды практически не влияют на проницаемость плазматических мембран клеток, они оказывают существенное влияние на функциональное состояние клеток печени.

Инкубация изолированных гепатоцитов в присутствии экзогенных как синтетического, так и натуральных церамидов существенно подавляет синтез общих липидов (рис. 2А) и глицерофосфолипидов (рис. 2Б,В).

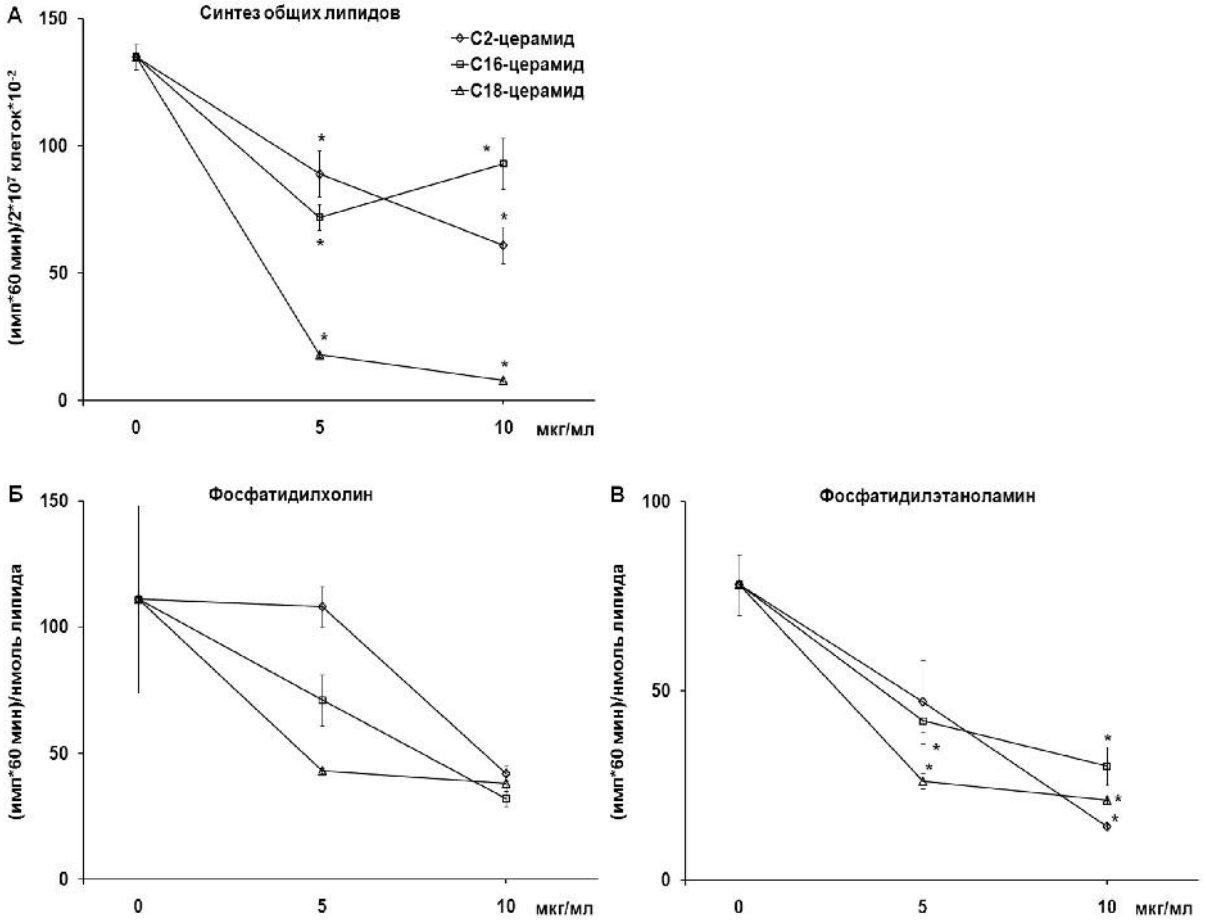

Рис. 2А.Б.В. Влияние экзогенных церамидов на синтез липидов в изолированных гепатоцитах.

Примечание: * - статистически значимо по сравнению с контролем (смесь етанол:додекан 49:1), $p \leq 0,05$.

Недавно установлено, что сфинголипиды играют важную роль в регуляции липогенеза и депонировании жира в организме. Так, установлено, что С2-церамид активирует липогенез в лейкоцитах человека (HL60) и фибробластах почек хомячка (BHK) [9]. Добавление экзогенного церамида в культуральную среду клеток меченых [^{14}C]ацетатом или [^{14}C]пальмитатом или [^{3}H]H_2O существенно снижает уровень вновь синтезированных фосфатидилхолина (ФХ) и увеличивает содержание триацилглицерола (ТАГ) и диацилглицерола. Однако, церамид, синтезированный de novo, может повышать уровень белков связывающих стерол-регуляторный элемент (SREBPs), участвующих в регуляции генов, кодирующих ферменты синтеза жирных кислот, холестерола и глицеролфосфолипидов [10]. Кроме этого, у Drosophila обнаружен ген schlank, регулирующий гомеостаз липидов [11]. Оказалось, что ген schlank кодирует церамидсинтазу. Важным представляется то, что у млекопитающих представители данного

семейства генов также влияют на липидный гомеостаз. Мутация данного гена приводит к снижению уровня сфинголипидов и уменьшению количества жировых депо в результате активации липаз и даун-регуляции SREBP-зависимого синтеза жирных кислот. Результаты данных исследований свидетельствуют о важной роли церамидсинтаз в регуляции липогенеза в организме.

Настоящими исследованиями установлено существенное подавление под действием экзогенных церамидов процесса синтеза эндогенных церамидов. Можно предположить, что снижение экспрессии церамидсинтаз в данных условиях эксперимента является одной из причин подавления липогенеза в клетках печени.

Ключевую роль в регуляции депонирования нейтральных липидов в клетках играет фосфолипаза Д (ФЛД) [12]. Инсулин активирует образование липидных капель в клетках и этот процесс подавляется при даун-регуляции ФЛД1 с помощью siRNA [12]. ФЛД является важной мишенью церамидов в клетках. Факторы роста и гормоны, включая инсулин, индуцируют активацию ФЛД в клетках-мишенях. Ранее проведенными исследованиями установлено, что в клетках печени индуцированная инсулином ФЛД катализирует гидролиз ФХ с образованием ФК и холина, и этот процесс ингибируется экзогенным С2-церамидом и внутриклеточными длинноцепочечными вновь синтезируемыми церамидами [8]. Церамид может непосредственно влиять на ФЛД, подавлять транскрипцию фермента, конкурировать с кофакторами ФЛД за связывание с каталитическим ядром фермента. Кроме того, накопление церамидов в липидных рафтах мембран может приводить к нарушению физических свойств этих структур и ингибированию ФЛД.

Настоящими исследованиями установлено, что внесение в культуральную среду С2-церамида существенным образом снижает индуцированное эмбриональной сывороткой или инсулином высвобождение [^{14}C]фосфатидной кислоты и образование [^{14}C]ФЭТ (рис.3), что свидетельствует о подавлении активности ФЛД в клетках печени. В то же время, С16- и С18-церамид не изменяли активность индуцированной ростовыми факторами и инсулином активности фермента в изолированных гепатоцитах.

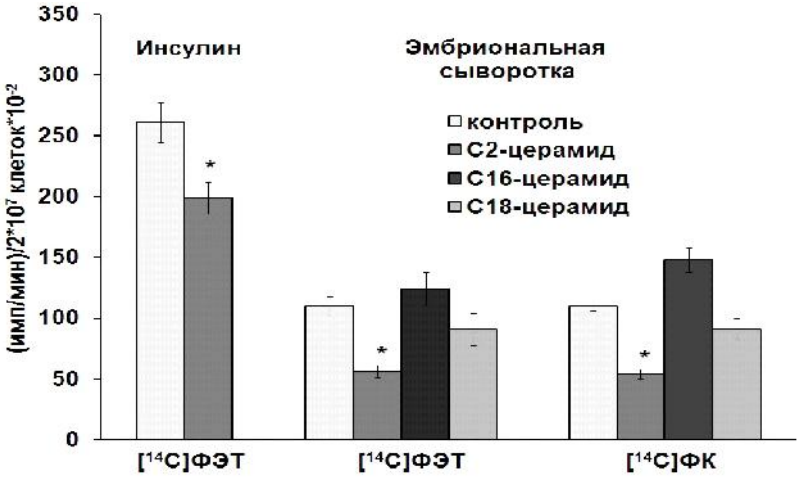

Рис. 3. Влияние экзогенных церамидов на индукцию инсулином и эмбриональной сывороткой ФЛД в изолированных гепатоцитах.

Примечание: * – статистически значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$

Учитывая то, что под действием экзогенных длинно-цепочечных церамидов увеличивается содержание в клетках эндогенных церамидов и то, что все применяемые в работе церамиды ингибируют липогенез в печени можно полагать, что различия в эффекте различных церамидов на активность ФЛД вряд ли зависит от степени их проникновения в клетки. Не исключено, что особенности действия С2- и С16-/18-церамидов на индуцированную ростовыми факторами и инсулином ФЛД зависят от различного их действия на регуляторные факторы и изоформы фермента.

В настоящее время две изоформы ФЛД клонированы и охарактеризованы – ФЛД1 и ФЛД2. Обе ФЛД активируются в клетках под действием инсулина [14]. В стимуляции ФЛД1 важную роль играют классические протеинкиназы С и малые G–белки: ARF и Rho, которые, в свою очередь, являются мишенями церамида. В условиях in vitro установлено, что С2- и С6-церамиды снижают упорядоченность липидного бислоя плазматических мембран и изменяют взаимодействие молекул, ассоциированных с липидными рафтами [15]. Структурные изменения мембран, индуцированные коротко-цепочечными церамидами, подавляют активность ФЛД1 и ФЛД2, и мобилизацию Ca^{+2} в стимулированных антигеном клетках RBL-2H3. В то же время, С16-церамид повышает активность ФЛД2 и не влияет на активность ФЛД1. Кроме этого, установлено, что С16-церамид существенно ингибирует ФЛД2 в дру-

гих клетках и при других условиях эксперимента [15]. Учитывая эти данные и результаты настоящей работы можно полагать, что отсутствие эффекта С16- и С18-церамидов на стимулированную эмбриональной сывороткой общую активность ФЛД может быть связано с различным их действием на различные типы ФЛД в клетках печени.

ВЫВОДЫ

В заключение следует отметить, что результаты настоящей работы свидетельствуют о существенной роли церамидов в нарушении метаболизма липидов в клетках печени. Независимо от длины ацильной цепи церамиды существенно снижают в гепатоцитах уровень вновь синтезированных липидов и синтеза основных фосфолипидов биологических мембран - ФХ и ФЭА. Таким образом, полученные в работе данные свидетельствуют о том, что церамиды, независимо от их структурных особенностей, являются важными модуляторами обмена липидов в клетках печени. В то же время, действие экзогенных церамидов на стимуляцию ростовыми факторами и инсулином активности ФЛД в клетках печени зависит от типа их ацильного остатка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Babenko N.A. Effects of long-term fish oil-enriched diet on the sphingolipid metabolism in brain of old rats / N.A. Babenko, Y.A. Semenova // Exptrimental Gerontology. – 2010. - Vol. 45, № 5. – P. 375–380.

2. Ceramide-mediated insulin resistance and impairment of cognitive-motor functions / S.M. de la Monte, M. Tong, V. Nguyen, [et al.] // Journal of Alzheimers Disease. – 2010. - Vol. 21, № 3. – P. 967–984.

3. Shabbits J.A. Intracellular delivery of ceramide lipids via liposomes enhances apoptosis in vitro / J.A. Shabbits, L.D. Mayer // Biochimica et Biophysica Acta. – 2003. - Vol. 1612, № 1. – P. 98–106.

4. Lahiri S. The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids / S. Lahiri, A.H. Futerman // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2007. - Vol. 64, № 17. – P. 2270–2284.

5. Antiapoptotic roles of ceramide-synthase-6-generated C16-ceramide via selective regulation of the ATF6/CHOP arm of ER-stress-response pathways / C.E. Senkal, S. Ponnusamy, J. Bielawski, [et al.] // FASEB Journal. – 2010. - Vol. 24, № 1. – P. 296–308.

6. A critical role for ceramide synthase 2 in liver homeostasis: I. alterations in lipid metabolic pathways / Y. Pewzner-Jung, H. Park, E.L. Laviad, [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2010. - Vol. 285, № 14. - 10902-10910.

7. Exton J.H. Phospholipase D-structure, regulation and function / J.H. Exton // Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology. – 2002. – Vol. 144. – P. 1–94.

8. Babenko N.A. Ceramides inhibit phospholipase D-dependent insulin signaling in liver cells of old rats / N.A. Babenko, V.S. Kharchenko // Biochemistry (Moscow). – 2012. - Vol. 77, № 2. – P. 180–186.

9. Pazdro R. The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications. / R. Pazdro, J.R. Burgess //Mechanisms of Ageing and Development. – 2010. - Vol. 131, № 4. – P. 276–286.

10. Worgall T.S. Sphingolipid synthetic pathways are major regulators of lipid homeostasis / T.S.Worgall // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2011. - Vol. 721. – 139–148.

11. Bauer R. Towards understanding regulation of energy homeostasis by ceramide synthases / R. Bauer / / Results and Problems in Cell Differentiation. – 2010. - Vol. 52. – P. 175–181.

12. PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation / L. Andersson, P. Bostrom, J. Ericson, [et al.] // Journal of Cell Science. – 2006. - Vol. 119, Pt 11. – P. 2246–2257.

13. Jenkins G.M. Phospholipase D: a lipid centric review / G.M. Jenkins, M.A. Frohman // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2005. – Vol. 62, № 19-20. – P. 2305–2316

14. Insulin-induced phospholipase D1 and phospholipase D2 activity in human embryonic kidney-293 cells mediated by the phospholipase C gamma and protein kinase C alpha signalling cascade / R. Slaaby, G. Du, Y.M. Altshuller, et al. // Biochemical Journal. – 2000. - Vol. 351, Pt 3. – P. 613–619.

15. Disruption of lipid order by short-chain ceramides correlates with inhibition of phospholipase D and downstream signaling by FcepsilonRI / A. Gidwani, H.A. Brown, D. Holowka, [et al.] // Journal of Cell Science. – 2003. - Vol. 116, Pt. 15. – P. 3177–3187.