

Л.Х.М Хассунех

## Накопление диацилглицерина нарушает краткосрочную активацию тироксином фосфолипазы Д в клетках печени

Университет Аль-Исра, Амман, Иордания, Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина; E-mail: loay.hassouneh@ju.edu.jo

*Изучали влияние модуляции содержания эндогенных диацилглицеринов (ДАГ) в изолированных гепатоцитах на краткосрочное действие L-тироксина (LT<sub>4</sub>). Эксперименты проводили на меченых [<sup>14</sup>C]пальмитиновой и [<sup>14</sup>C]олеиновой кислотой гепатоцитах 3- и 24-месячных крыс в условиях модуляции содержания ДАГ. Для оценки краткосрочного действия гормона изучали активацию фосфолипазы Д через 2 и 5 мин воздействия LT<sub>4</sub> на клетки. Установлено накопление ДАГ в клетках печени в старости и под действием их предшественника - пальмитиновой кислоты в гепатоцитах молодых крыс. Снижение содержания ДАГ в старых и молодых гепатоцитах, культивируемых в присутствии пальмитиновой кислоты, с помощью активации ДАГ-киназы α-токоферол ацетатом или в результате длительного воздействия LT<sub>4</sub> сопровождается восстановлением способности клеток адекватно отвечать на краткосрочное действие гормона. Эти результаты свидетельствуют о важной роли ДАГ в нарушении активации LT<sub>4</sub> фосфолипазы Д и о существовании взаимодействия долго- и краткосрочных путей регуляции обмена липидов в печени.*

*Ключевые слова: старение; гепатоциты; пальмитиновая кислота; диацилглицерины; тироксин; фосфолипаза Д.*

### ВВЕДЕНИЕ

Дицилглицерины (ДАГ) являются важными компонентами метаболических путей обмена глицеролипидов и играют ключевую роль в процессах сигнальной трансдукции. В то же время хроническое накопление в клетках предшествует изменению их чувствительности к действию ряда гормонов и регуляторных факторов. Относительно высокое базальное содержание этих компонентов и мембранно-связанной протеинкиназы С коррелирует с потерей чувствительности клеток отвечать на действие форболовых эфиров, вазопрессина и кальциевого ионофора – A23187 [1, 2]. Индуцированное высокожировой диетой накопление содержания ДАГ в печени и скелетной мышечной ткани сопровождается развитием резистентности клеток к действию

© Л.Х.М Хассунех

инсулина [3, 4]. В печени они активируют протеинкиназу С<sub>ε</sub>, которая ингибирует киназу инсулинового рецептора, что в свою очередь снижает стимулированное инсулином фосфорилирование тирозина субстрата 1 и 2 инсулинового рецептора, подавляет стимуляцию гормоном фосфатидилинозитол-3-киназы, протеинкиназы – Akt2, снижает синтез гликогена и супрессию глюконеогенеза.

Установлено, что L-тироксин (LT<sub>4</sub>) вызывает быструю и кратковременную активацию фосфолипаз С и Д и образование ДАГ в изолированных гепатоцитах молодых крыс, что сопровождается транслокацией протеинкиназы С из цитозоля в мембраны клеток и ее активацией [5]. Нарушение функции щитовидной железы при старении или при действии мерказолила сопровождается накоплением ДАГ в

гепатоцитах и плазматических мембранах клеток [6], что не изменяет перераспределение протеинкиназ С между цитозолем и мембранами, однако снижает общую активность фермента в клетках печени. Было высказано предположение, что накопление ДАГ в клетках и их плазматических мембранах может нарушать сигнальную трансдукцию.

Цель настоящей работы – изучить, влияет ли модуляция содержания эндогенных ДАГ в изолированных гепатоцитах на краткосрочное действие  $LT_4$ .

## МЕТОДИКА

Исследования проводили на молодых (3-месячных) и старых (24-месячных) крысах-самцах линии Вистар. Гепатоциты выделяли по методу Петренко и соавт. [7]. Нативность гепатоцитов оценивали с помощью трипанового синего. Выживаемость клеток составила 90 – 96 %. Для изучения содержания вновь синтезированных ДАГ в гепатоцитах молодых и старых крыс клетки ресуспендировали в среде Игла (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Россия), содержащей 10%-ю эмбриональную сыворотку (ООО «БиолоТ», Россия), 20 ммоль/л Нерес, пенициллин (61 мг/л), стрептомицин (100 мг/л), до  $4 \cdot 10^7$  клеток/мл и инкубировали 3 ч при 37°C в присутствии [ $^{14}C$ ]пальмитиновой кислоты (0,037 МБк/мл) (2,07 ГБк/ммоль, «Amersham», GE Health Care, Великобритания). Кусочки печени молодых и старых крыс инкубировали в бикорбонатном буфере Кребса—Рингера, рН 7,4 3 ч при 37°C в присутствии [ $^{14}C$ ]пальмитиновой кислоты (0,037 МБк/мл) (2,07 ГБк/ммоль, «Amersham», GE Health Care, Великобритания). После инкубации гепатоциты и кусочки печени отмывали буфером Кребса-Хенселейта с 0,1% BSA («Sigma», США) и использовали для экстракции липидов и разделения ДАГ, как описано ниже. Для увеличения содержания эндогенных ДАГ в гепатоцитах молодых крыс клетки печени

преинкубировали 6 и 24 ч в присутствии 0,75 ммоль/л пальмитиновой кислоты и содержание ДАГ определяли, как описано ранее [6]. С целью его снижения в гепатоцитах преинкубированных с пальмитиновой кислотой в среду инкубации добавляли активатор ДАГ-киназы  $\alpha$ -токоферол ацетат (100 мкг/мл). Для изучения краткосрочного действия  $LT_4$  на активность фосфолипазы Д гепатоциты предварительно меченые в течение 24 ч [ $^{14}C$ ]олеиновой кислотой (0,037 МБк/мл, 2,14 ГБк/ммоль, «Amersham», GE Health Care, Великобритания) инкубировали 2 и 5 мин в присутствии  $LT_4$  (10 нмоль/л) или 100 нмоль/л NaOH (контроль). Для изучения влияния длительного воздействия  $LT_4$  на содержание ДАГ в гепатоцитах и краткосрочную активацию фосфолипазы Д  $LT_4$  клетки печени, меченые [ $^{14}C$ ]олеиновой кислотой (0,037 МБк/мл, 2,14 ГБк/ммоль, Amersham, GE Health Care, Великобритания) предварительно подвергали воздействию  $LT_4$  (10 нмоль/л) или 100 нмоль/л NaOH (контроль) в течение 24 ч. Далее гепатоциты отмывали буфером Кребса-Хенселейта с 0,1%-м альбумином сыворотки быка («Sigma», США) и инкубировали 2 и 5 мин в присутствии  $LT_4$  (10 нмоль/л) или 100 нмоль/л NaOH (контроль). Об активации фосфолипазы Д судили по содержанию субстрата фермента [ $^{14}C$ ]фосфатидилхолина или [ $^{14}C$ ]фосфатидилэтанола, фосфолипида, который образуется исключительно фосфолипазой Д через трансфосфатидилирование в присутствии этанола [1, 2, 5]. Экстракцию липидов проводили по методу Bligh, Dyer [8], разделение ДАГ – методом тонкослойной хроматографии на пластинках Sorbfil (АО «Сорбполимер», Россия) в системе растворителей – гексан:диэтиловый эфир:ледяная  $CH_3COOH$  (73:25:2). Для разделения фосфатидилхолина использовали  $CH_3CH_2OCH_2CH_3$  (система 1) и  $CHCl_3:CH_3OH:H_2O$  (40:10:1) (система 2). Пятна липидов проявляли в парах йода, идентифицировали, сравнивая со стандартами, и радиоактивность меченых [ $^{14}C$ ]-

ДАГ, [ $^{14}\text{C}$ ]фосфатидилхолина и [ $^{14}\text{C}$ ]фосфатидилэтанола определяли с помощью счетчика радиоактивности БЕТА. Результаты представлены в виде: среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Для сравнения двух групп использовали критерий t Стьюдента, для сравнения данных полученных в результате множественного воздействия использовали многофакторный дисперсионный анализ. Статистический анализ проводили с помощью StatSoft Statistica v6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Активация самых различных метаболических путей может приводить к аккумуляции ДАГ в клетках и тканях [9]. В дополнение к синтезу ДАГ *de novo* в клетках существуют три альтернативных пути их образования: сфингомиелинсинтаза-, фосфолипаза С- и фосфолипаза Д-опосредованных. Следует отметить, что активация сфингомиелинсинтаз и фосфолипаз происходит преимущественно в стимулированных клетках и образующийся при этом ДАГ не используется в метаболических целях, а, взаимодействуя с белками-эффекторами, участвует в процессах сигнальной трансдукции [10, 11]. Несмотря на то, что в клетках поддерживается постоянное, адекватное ее функциональному состоянию, содержание ДАГ, при хроническом действии на клетку различных стрессорных факторов может происходить накопление данного липида как в липидных каплях, так и в мембранах. Установлено, что у старых крыс значительно усиливается синтез ДАГ в присутствии [ $^{14}\text{C}$ ]линоленовой, [ $^3\text{H}$ ]арахидоновой жирных кислот и [ $^{14}\text{C}$ ]CH<sub>3</sub>COOH в печени, изолированных гепатоцитах и плазматических мембранах клеток по сравнению с молодыми крысами [6, 12]. Показано, что в печени и изолированных гепатоцитах старых крыс, по сравнению с молодыми животными, двукратно усиливается синтез ДАГ в присутствии [ $^{14}\text{C}$ ]пальмитиновой кислоты, что свидетельствует о том, что в старости

усиливается синтез ДАГ *de novo* (рис. 1).

При длительном культивировании гепатоцитов молодых крыс в присутствии пальмитиновой кислоты также накапливается ДАГ в клетках (рис. 2,а). Учитывая эти результаты можно полагать, что пальмитат имитирует возрастные изменения синтеза ДАГ в клетках печени, что согласуется с ранее проведенными исследованиями. Длительное содержание молодых животных на пищевом рационе, обогащенном насыщенными жирами, приводит к накоплению ДАГ в печени, мышечной ткани и неокортексе [13].

Тиреоидные гормоны, также как и жиры пищевого рациона, являются важными регуляторами липогенеза в печени [14]. Под их контролем находятся ключевые ферменты синтеза липидов: синтаза жирных кислот, ацетил-СоА-карбоксилаза и многие другие. Возрастные или индуцированные лекарственными препаратами нарушения функции щитовидной железы изменяют обмен различных пулов ДАГ в клетках печени [6].

Снижение содержания тиреоидных гормонов, циркулирующих в организме 24- или 3-месячных животных, получавших тиреостатик мерказолил, сопровождается накоплением ДАГ в печени, изолированных клетках и плазматических мембранах гепатоцитов преимущественно за счет усиления их синтеза. Однократная инъекция LT<sub>4</sub> этим животным существенно снижает синтез и массу ДАГ в печени и мембранах клеток. Большая часть эффектов тиреоидных гормонов на гомеостаз липидов связана с ядерными рецепторами и проявляется через длительный период времени с момента действия гормонов на клетки-мишени. Однако, известно, что тиреоидные гормоны могут быстро негеномно в течение секунд и минут модулировать важные сигнальные пути в клетках [15, 16]. Мишенями тиреоидных гормонов являются цитозольные белки (фосфатидилинозитол-3-киназа, протеинкиназы Akt и C, митоген-активируемые киназы. В течение первых

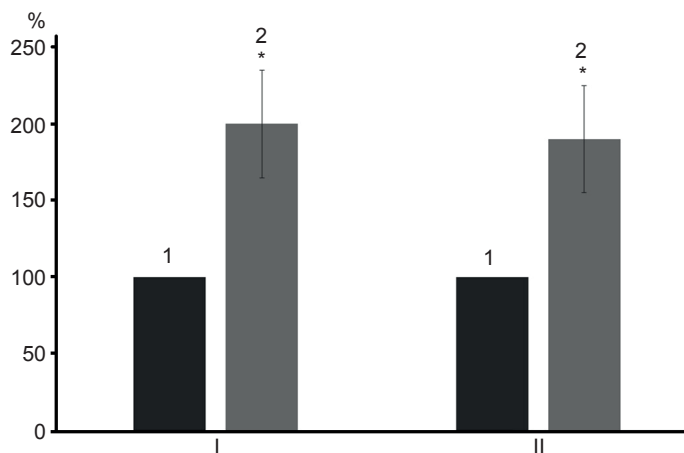


Рис. 1. Содержание вновь синтезированного диацилглицерина в печени (I) и изолированных гепатоцитах (II) 3- (1) и 24-месячных (2) крыс. \*  $P < 0,05$  относительно 3-месячных крыс

секунд действия  $LT_4$  на гепатоциты происходит активация фосфолипазы С, деградация фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата и кратковременное накопление ДАГ и инозитол-1,4,5-трисфосфата [5, 17]. Образовавшийся под действием  $LT_4$  инозитол-1,4,5-трисфосфат в последующем вызывает мобилизацию ионов кальция из внутриклеточного депо и совместно с ДАГ – активацию и транслокацию в мембраны протеинкиназы С. Последняя в свою очередь приводит к активации фосфатидилхолинспецифичной фосфолипазы Д, гидролазы фосфатидной кислоты и второму более продолжительному пику

ДАГ в гепатоцитах. ДАГ, образующийся в ходе активации фосфолипазы Д и гидролазы фосфатидной кислоты, может усиливать действие тиреоидных гормонов на протеинкиназу С и протеинкиназа С-зависимую активацию данных ферментов и их экспрессию.

Установлено, что несмотря на то, что в гепатоцитах старых крыс, по сравнению с молодыми животными, увеличивается базальное содержание ДАГ,  $LT_4$  не вызывает быструю активацию фосфолипазы Д (рис. 3).

Подобные результаты получены не только при измерении содержания субстрата

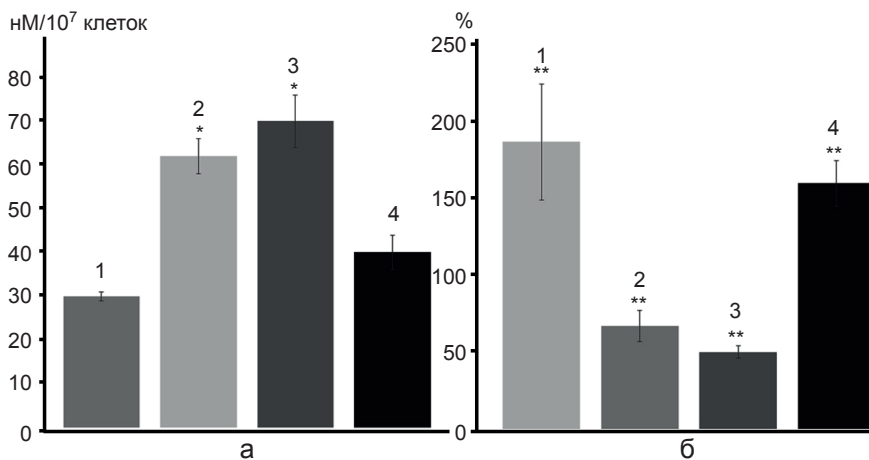


Рис. 2. Влияние пальмитиновой кислоты на содержание диацилглицерина (а) и краткосрочную активацию тироксином фосфолипазы Д (б) в гепатоцитах 3-месячных крыс. 1 – контроль, 2 – инкубация с пальмитиновой кислотой в течение 6 ч, 3 – в течение 24 часов, 4 – инкубация с пальмитиновой кислотой и  $\alpha$ -токоферол ацетатом в течение 24 ч. \*  $P < 0,05$  относительно контрольных клеток; \*\*  $P < 0,05$  относительно клеток, инкубированных с NaOH

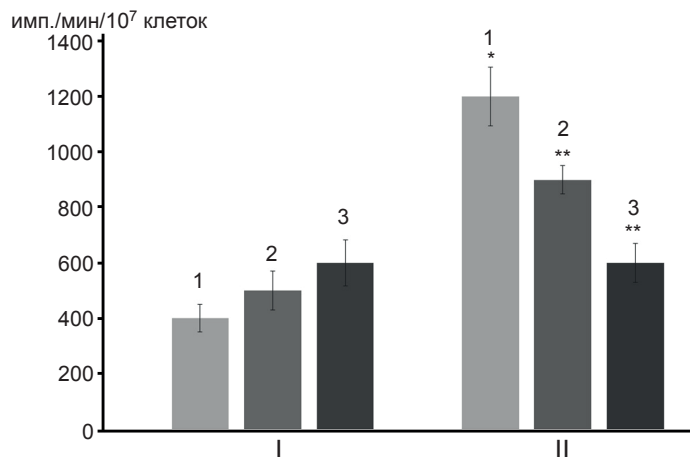


Рис. 3. Влияние длительного воздействия L-тироксина (LT<sub>4</sub>) на краткосрочную активацию гормоном фосфолипазы Д в гепатоцитах 24-месячных крыс. I – клетки преинкубированные 24 ч с NaOH. II – с LT<sub>4</sub>. 1 – контроль (NaOH), 2 – LT<sub>4</sub> 2 мин, 3 – LT<sub>4</sub> 5 мин. \* P<0,05 относительно базального содержания [<sup>14</sup>C]фосфатидилхолина; \*\* P<0,05 различия относительно контроля

фермента [<sup>14</sup>C]фосфатидилхолин (рис. 3), но и продукта фосфолипазной реакции [<sup>14</sup>C]фосфатидилэтанола. Так, его содержание в контроле, через 2 и 5 мин воздействия LT<sub>4</sub> составляло 1600±170, 1510±160, 1690±195 имп./мин на 10<sup>8</sup> клеток соответственно. Однако длительное культивирование старых клеток в присутствии LT<sub>4</sub> существенно снижает базальное содержание ДАГ (170±10 и 98,9±7,6 нмоль/10<sup>7</sup> клеток в контроле и опыте соответственно, P<0,05), повышает базальное содержание субстрата фосфолипазы Д фосфатидилхолина и восстанавливает ответ клеток на краткосрочное действие гормона (рис 3). Снижение базального содержания ДАГ в клетках, предварительно культивируемых в присутствии пальмитиновой кислоты в результате активации ДАГ-киназы с помощью α-токоферол ацетата (рис. 2,а), также восстанавливает способность гепатоцитов отвечать на кратковременное действие гормона (рис. 2,б).

Таким образом, накопление ДАГ в клетках печени старых крыс и индуцированное пальмитиновой кислотой в гепатоцитах молодых животных происходит за счет усиления их синтеза. Однако тот факт, что активация метаболизма липидов приводит к снижению содержания вновь синтези-

рованного ДАГ в гепатоцитах, может свидетельствовать о вкладе ДАГ-киназы в этот процесс. В то же время, коррекция содержания ДАГ в старых клетках с помощью их длительного культивирования в присутствии LT<sub>4</sub> может происходить не путём подавления липогенеза *de novo*, а за счет усиления использования предшественников в синтезе фосфатидилхолина. Снижение содержания ДАГ в старых клетках и молодых гепатоцитах, культивируемых в присутствии пальмитиновой кислоты, с помощью активации ДАГ-киназы или длительного воздействия LT<sub>4</sub> сопровождается восстановлением способности клеток адекватно отвечать на краткосрочное действие гормона. Эти результаты свидетельствуют о важной роли ДАГ в нарушении активации LT<sub>4</sub> фосфолипазы Д и о существовании взаимодействия долго- и краткосрочных путей регуляции обмена липидов в печени.

Л. Х. М Хассунех

#### НАКОПИЧЕННЯ ДІАЦИЛГЛІЦЕРИНУ ПОРУШУЄ КОРОТКОСТРОКОВУ АКТИВАЦІЮ ТИРОКСИНОМ ФОСФОЛІПАЗИ Д У КЛІТИНАХ ПЕЧІНКИ

Вивчали чи впливає модулювання вмісту діацилглицерину (ДАГ) у гепатоцитах на короткострокову дію LT<sub>4</sub>.

Для цього експерименти проводили на мічених [ $^{14}\text{C}$ ] пальмітиновою чи [ $^{14}\text{C}$ ]олеїновою кислотами гепатоцитах 3- та 24-місячних шурів. Для визначення короткострокової дії  $\text{L-T}_4$  на клітини вивчали активацію фосфолипази Д через 2 і 5 хвилин дії гормону. Встановлено накопичення вмісту ДАГ у гепатоцитах старих шурів та молодих клітинах, які інкубували у присутності пальмітинової кислоти. Зниження вмісту ДАГ в клітинах за допомогою активації ДАГ-кінази у присутності альфа-токоферол ацетату або довгострокової дії  $\text{L-T}_4$  поліпшувало чутливість клітин до дії гормону. Таким чином, встановлена важлива роль ДАГ у порушенні активації  $\text{L-T}_4$  фосфолипази Д у старих шурів та взаємодія між довго- та короткостроковими шляхами регуляції  $\text{L-T}_4$  метаболізму ліпідів у клітинах печінки. Ключові слова: старіння, гепатоцити, пальмітинова кислота, диацилглицерин, тироксин, фосфолипаза Д.

**Loay Kh.M. Hassouneh**

### DIACYLGLYCEROL ACCUMULATION IMPAIRS SHORT-TERM ACTIVATION OF PHOSPHOLIPASE D BY THYROXINE IN THE LIVER CELLS.

Thyroid hormones (TG) are known modulators of signal transduction. Phospholipase D (PLD) is one of the targets of TG in the stimulated cells. Response of cells to the short-term TG action significantly reduces at old age. Taking into account that diacylglycerol (DAG) accumulation induces the resistance of cells to some of regulatory factors in the target cells the aim of the present study was to determine if DAG content increase in hepatocytes impairs the L-thyroxine ( $\text{L-T}_4$ ) short-term action. The experiments were performed in either the [ $^{14}\text{C}$ ]palmitic acid- labeled hepatocytes or [ $^{14}\text{C}$ ]oleic acid-pre-labeled liver cells of 3- and 24-month-old rats. To study the short-term  $\text{L-T}_4$  action on cells the PLD activation was determined. The DAG production and content in hepatocytes significantly increased at old age and in the young cells pre-treated with palmitic acid. The reduction of DAG level in cells by means of DAG-kinase activator, alfa-tocopherol acetate, or long-term  $\text{L-T}_4$  treatment improved the short-term hormone action. The above data have indicated that DAG play important role in the  $\text{L-T}_4$  PLD regulation. The cross-talk between classic and non-genomic pathways of TG regulation of lipid metabolism has been determined.

Key words: aging, hepatocytes, palmitic acid, diacylglycerol, thyroxine, phospholipase D.

*Faculty of Pharmacy, Al-Isra University, P.O. Box 22, Amman, 11622, Jordan;*

*Department of Physiology of Ontogenesis, Institute of Biology, Kharkov Karazin National University, 4 Svobody pl., 61022, Kharkov, Ukraine; E-mail: loay.hassouneh@iu.edu.jo*

### REFERENCES

- Gustavsson L, Moehern G, Torres-Marquez ME, Benistant C, Rubin R, Hock JB. The role of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ , protein kinase C and protein kinase A in hormonal stimulation of phospholipase D in rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1994; 269:849-859.
- Pettitt TR, Martin A, Horton T, Lioussis C, Lord JM, Wakeham MJO. Diacylglycerol and phosphatidate generated by phospholipase C and D, respectively, have distinct fatty acid compositions and function. Phospholipase D-derived diacylglycerol does not activate protein kinase C in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem.* 1997; 15(5):574-84.
- Jornayvaz FR, Shulman GI. Diacylglycerol activation of protein kinase C $\alpha$  and hepatic insulin resistance. *Cell Metab.* 2012; 15(5):574-584.
- Erion DM, Shulman GI. Diacylglycerol-mediated insulin resistance. *Nat Med.* 2010; 16(4):400-402.
- Kavok NS, Krasilnikova OA, Babenko NA. Thyroxine signal transduction in liver cells involves phospholipase C and phospholipase D activation. Genomic independent action of thyroid hormone. *BMC Cell Biol [Internet].* 2001 Apr. 2(5). Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2121/2/5>.
- Krasilnikova OA, Kavok NS, Babenko NA. Drug-induced and postnatal hypothyroidism impairs the accumulation of diacylglycerol in liver and liver cell plasma membranes. *BMC Physiol [Internet].* 2002 Aug. 2(12). Available from: <http://www.biomedcentral.com/1472-6793/2/12>.
- Petrenko AIu, Sukach AN, Rosliakov AD. Isolation of rat hepatocytes by a nonenzymatic method: detoxifying and respiratory activity. *Biokhimiia.* 1991; 56(9):1647-51 (Russian).
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959; 37(8):911-917.
- Carrasco S, Merida I. Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends Biochem Sci.* 2007; 32(1):27-36.
- Yang C, Kazanietz MG. Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC. *Trends Pharmacol. Sci.* 2003; 24(11):602-608.
- Brose N, Betz A, Wegmeyer H. Divergent and convergent signaling by the diacylglycerol second messenger pathway in mammals. *Curr Opin Neurobiol.* 2004; 14(3):328-340.
- Kavok NS, Krasilnikova OA, Babenko NA. Increase in diacylglycerol production by liver and liver cell nuclei at old age. *Exp Gerontol.* 2003; 38:441-447.
- Babenko NA. Effects of short- and long-term saturated fat-enriched diet on the ceramide and neutral lipids accumulation in the insulin responsive tissues of rats. In: Langella JP, editor. *Saturated fats: Metabolism, Disease Risks and Public Awareness.* New York: Nova Science Publishers; 2012. 71-97.
- Girard J, Perdureau D, Foufelle F, Prip-Buus C, Ferre P. Regulation of lipogenic enzyme gene expression by

- 
- nutrients and hormones. FASEB J. 1994; 8(1):36-42.
15. Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. Front Neuroendocrinol. 2008; 29:211-218.
16. Cordeiro A, Souza LL, Einicker-Lamas M, Pazos-Moura CC. Non-classic thyroid hormone signalling involved in hepatic lipid metabolism. J Endocrinol. 2013 Feb 25; 216(3):R47 - R57.
17. Krasilnikova OA, Kavok NS, Babenko NA. Role of calcium ions in rapid effects of L-thyroxine on phosphoinositide metabolism in rat liver cells. Biochemistry (Moscow). 2003; 68(7):776-782.

*Материал поступил в редакцию 14.03.2014*