
РОЛЬ СФИНГОЗИНА В ИНДУКТОРНЫХ МЕХАНИЗМАХ АПОПТОЗА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Ю.А. Белоус

Кафедра психотерапии и наркологии ФПКМР
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, д. 21, корп. 3, ФПКМР, Москва, Россия, 117198

И.А. Комаревцева

Кафедра медицинской химии ЛГМУ
квартал 50-летия Оборона Луганска, 1, г. Луганск, Украина, 91045

В.Н. Комаревцев

Кафедра хирургии и урологии ЛГМУ
квартал 50-летия Оборона Луганска, 1, г. Луганск, Украина, 91045

Изучена роль сфингозина в активации апоптоза при экспериментальной острой почечной недостаточности. Установлено, что уровень сфингозина в клетке регулируется проапоптотическими агентами, такими как фактор некроза опухоли, дексаметазон, химиотерапевтическими агентами. Противоположные динамики содержания сфингомиелина и сфингозина подтвердили предположение о существовании сфингомиелинового метаболического пути, в котором генерируется сфингозин, в передаче сигнала апоптоза в рамках данной модели.

Программируемая клеточная смерть развивается по специфической программе, в которой продукты сфингомиелинового цикла — церамид и сфингозин — играют важную роль. Как вторичные посредники они обеспечивают трансдукцию различных внешних сигналов в клетку и, одновременно, действуют как межклеточные медиаторы.

Было обнаружено, что гликосфинголипиды участвуют в процессах клеточного роста, дифференциации, распознавании межклеточного взаимодействия и трансмембранной трансдукции сигнала [7]. Сфинголипиды и их метаболиты (сфингозин, сфингозин-1-фосфат и церамиды) участвуют в процессах клеточной пролиферации и апоптоза [5, 6, 10].

Анализ данных относительно биологического действия различных типов липидов указывает, что на клетки могут одновременно воздействовать несколько липидных молекул. Например, белковая киназа С может быть инициирована диацилглицеролом и подавлена сфингозином, апоптоз активируется церамидом и подавляется диацилглицеролом. Или, наоборот, тот же самый эффект может быть вызван различными липидными биорегуляторами. Так, сфингозин, сфингозин-1-фосфат, арахидоновая кислота стимулируют выход Ca^{2+} , сфингозин и церамид стимулируют апоптоз и т.д. [6].

Установлено, что уровень сфингозина в клетке, как и уровень церамида, регулируется одними и теми же проапоптотическими агентами, такими как фактор некроза опухоли, дексаметазон, активаторы рецептора FAS, химиотерапевтическими агентами и ионизирующей радиацией [1].

Наше исследование было посвящено изучению роли сфингозина в проведении сигнала апоптоза, индуцируемого ишемией в почечной ткани.

Материалы и методы. Работу проводили на крысах-самцах линии Вистар 16-недельного возраста. Ишемию в почечной ткани вызывали формированием экспериментальной острой почечной недостаточности (ОПН). Животные забивались декапитацией на 1-е, 2-е и 3-е сутки. Контролем служили две группы животных. I — интактные крысы соответствующего возраста; II — крысы 30-минутной постишемии.

Сфингомиелин выделялся по методике, ранее нами описанной [2].

Выделение свободного сфингозина проводили модифицированным методом, описанным в руководстве под редакцией проф. М.И. Прохоровой [4]. Количественное содержание сфингозина определяли колориметрическим методом (Lauter, Trams) на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 415 нм. По калибровочной кривой стандартного раствора сфингозина рассчитывали содержание сфингозина в пересчете на 100 мг ткани.

Апоптическую форму клеточной гибели определяли по фрагментации ДНК дифениламиновым тестом [3].

Достоверность различий между значением экспериментальных групп определялась по критерию *t*-Стьюдента.

Результаты исследования. Из представленных на рис. 1 данных видно, что содержание сфингомиелина в I контрольной группе имеет максимальное значение по сравнению с II группой контроля и экспериментальными группами. Наименьшие показатели концентрации сфингомиелина характерны для 3-суточной опытной группы ($0,35 \pm 0,05$) и II контрольной группы ($0,45 \pm 0,04$). Эти результаты указывают на наличие двух пиков апоптической гибели клеток. После 30 минут ишемии начинается распад сфингомиелина до церамида и фосфохолина вследствие активации сфингомиелиназы, как указывают авторы [8]. На первые сутки постишемии этот процесс несколько тормозится, по-видимому, усиливается антиапоптотический потенциал клетки. Но ко вторым суткам это явление усугубляется и достигает своей критической точки. У 3-суточных животных наблюдается повышение концентрации сфингомиелина в клетках, что соответствует восстановительной фазе острой почечной недостаточности за счет снижения содержания молекул-ингибиторов апоптоза.

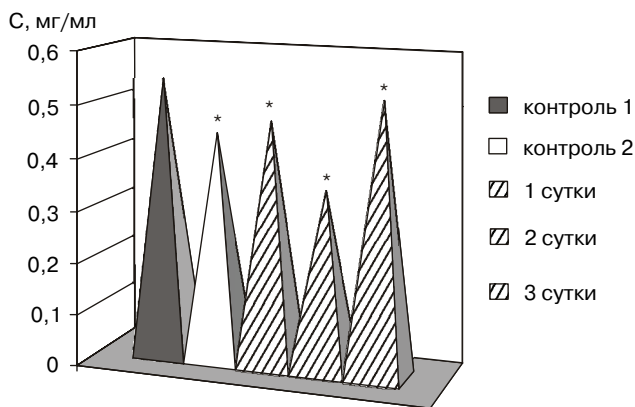


Рис. 1. Содержание сфингомиелина в 1 мл гомогената почечной ткани

*— $p < 0.05$

Критическая роль в регуляции клеточных процессов через сигнальный сфингомиелиновый путь принадлежит церамиду, который, являясь сам по себе вторичным мессенджером [9], метаболизируется в биоактивные молекулы: сфингозин и церамид-1-фосфат.

Известно, что их эффекты реализуются по независимому от ПКс (протеинкиназы С) пути.

Полагают, что не только церамид, но и сфингозин, образуемый при отщеплении от церамида жирной кислоты, способен индуцировать как пролиферацию, так и апоптоз.

Из полученных нами данных (рис. 2) следует, что динамика содержания сфингозина в клетках почек имеет максимум в группе двухсуточных животных. При этом изменение содержания сфингозина от первых суток ко вторым суткам происходит по нарастающей, что соответствует олигоанурическому периоду ОПН, а к третьим суткам (фаза восстановления) — по убывающей.

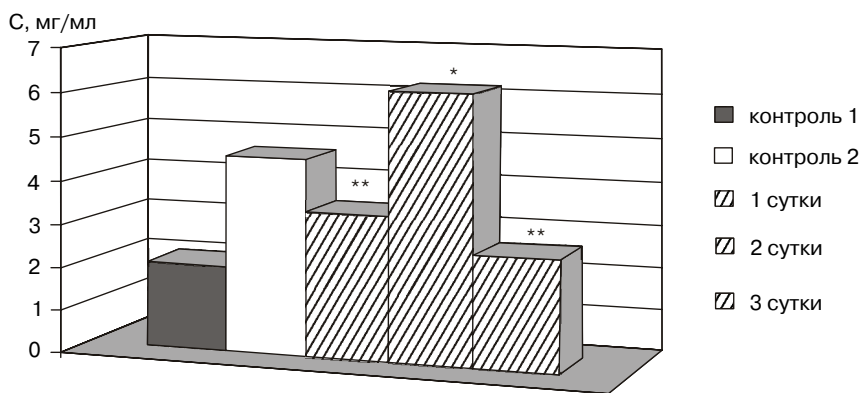


Рис. 2. Содержание сфингозина в клетках почечной ткани

** — $p < 0.01$

* — $p < 0.05$

Следует отметить, что показатели второй контрольной группы почти в 2 раза превышают таковые в I группе контроля. По-видимому, уже в первые часы (30 минут) развития острой почечной недостаточности идет активация апоптоза и наблюдается его первый пик.

Таким образом, противоположные динамики содержания сфингомиелина и сфингозина подтвердили предположение о существовании сфингомиелинового метаболического пути, в котором генерируется сфингозин, в передаче сигнала апоптоза в рамках данной модели.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Алесенко А.В. Функциональная роль сфингозина в индуцированном апоптозе // Ж. Биохимия. — 1997. — № 58. — С. 461—475.
- [2] Орлова Е.А., Благодаренко Е.А., Фильчуков Д.А. Методика определения сфингомиелина в почечной ткани // Украинський медичний альманах. — 2001. — Т. 4. — № 6. — С. 120—123.

- [3] Орлова Е.А., Комаревцев В.Н. Определение фрагментации ДНК в клетках почечной ткани // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики. — Луганськ, 2001. — Вип. 6. — С. 206—208.
- [4] Методы биохимических исследований / Под ред. М.И. Прохоровой. — Л., 1982. — С. 94—95.
- [5] Alessenko A. Sphingosine in cell growth and death // J. Biochem. — 1998. — N 63. — P. 64—70.
- [6] Dyatavitskaya E.V., Beznglov V.V. Lipids as bioeffectors. Introduction // J. Biochem. — 1998. — № 63. — P. 57—63.
- [7] Futerman A. Sphingolipids and their metabolites as second messengers in the processes of cell growth, differentiation and apoptosis // J. Biochem. — 1998. — № 63. — P. 76—86.
- [8] Jwata H., Herrington J., Zager R.A. Sphingosine: a mediator of acute renal tubular injury and subsequent cytoresistance // Am. J. Physiol. — 1996. — Vol. 92. — P. 8970—8974.
- [9] Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis / Haimovitz, Fridman A., Kan C.C. // J. Exp. Med. — 1994. — Vol. 180. — P. 525—534.
- [10] Martinova E.A. Roles of sphingosine-1-phosphate in all growth, differentiation and death // J. Biochem. — 1998. — № 63. — P. 105—113.

ROLE OF SPHINGOSINE IN INDUCED MECHANISMS OF APOPTOSIS OF EXPERIMENTAL ACUTE RENAL TUBULAR INJURY

Y.A. Belous

Department of psychotherapy and narcology FIPMS
Peoples Friendship University of Russia
M-Maclaya str., 21, k. 3, Moscow, Russia, 117198

I.A. Komarevtseva

Department of medical chemistry LGMU
50 let Oboroni Luganska boulevard, 1, Lugansk, Ukraina, 91045

V.N. Komarevtsev

Department of surgery and urology LGMU
50 let Oboroni Luganska boulevard, 1, Lugansk, Ukraina, 91045

Develop of apoptosis is a specific program. The sphingomyelne metabolites as ceramide and sphingosine, play an important role in programmed cell death.

It is known, that sphingosine is initiate as proliferation and apoptosis.

The purpose of this work is studies the roles of sphingosine in apoptosis activation due to acute renal tubular injury.

Our experimental data confirm supposition of existence sphingomyelne metabolic way in activation of apoptosis. We are receive the date with contrary maintenance dynamics sphingomyelne and sphingosine in the kidney cells.