

and TNF- α level. Blocking iNOS-induced NO synthesis leads to changes in the capacity of nitrite and nitrate anions and reduces activity of iNOS in the liver and blood.

Keywords: proinflammatory cytokines, endothelial NO-synthase, inducible NO-synthase, nitric oxide, liver

Рекомендує до друку

Надійшла 09.09.2014

О.Б. Столяр

УДК 615.324.:665.213+612.015.11+547.295.92] - 02:613.2

¹О.С. ПОКОТИЛО, ¹М.Д. КУХТИН, ²М.І. КОВАЛЬ, ²Т.Я. ЯРОШЕНКО

¹Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя

вул. Руська, 56, Тернопіль, 46001

²ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України»
майдан Волі 1, Тернопіль, 46001

ЛІПОГЕНЕЗ І ХОЛЕСТЕРОЛОГЕНЕЗ У ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН ПІСЛЯ НАВАНТАЖЕННЯ ХОЛЕСТЕРОЛОМ

Досліджували *in vitro* інтенсивність синтезу ліпідів різних класів (жирних кислот, холестеролу, фосфоліпідів і ацилгліцеролів) в гомогенатах головного мозку після одноразового щоденного упродовж 30 діб навантаження білих щурів і морських свинок холестеролом (300 мг/кг маси тіла). Для цього в гомогенатах головного мозку білих щурів і морських свинок, які інкубували окремо із [6-¹⁴C] глюкозою, [2-¹⁴C] лізином або [1-¹⁴C] пальмітиновою кислотою, визначали радіоактивність ліпідних фракцій. Встановлено інгібуючий вплив холестеролу за підвищення його рівня в раціоні білих щурів і морських свинок на синтез жирних кислот, холестеролу та інших класів ліпідів в головному мозку при використанні як попередника ліпідів [6-¹⁴C] глюкози і [2-¹⁴C] лізину та відсутність інгібуючого впливу холестеролу при інкубації з [1-¹⁴C] пальмітиновою кислотою.

Ключові слова: ліпіди, холестерол, морські свинки, щури, головний мозок, гіперхолестеринемія

Головний мозок людини і вищих тварин характеризується значно більшим вмістом холестеролу і фосфоліпідів, ніж інші органи і тканини, за виключенням наднирників [6] та відносною стабільністю ліпідного і жирнокислотного складу [5]. Основним ліпогенним і енергетичним субстратом у головному мозку є глюкоза [11], метаболізм якої аеробним шляхом забезпечує продукцію ацетил-СоА з пірувату, а також 3-гліцерофосфату. Утворений при декарбоксілюванні пірувату ацетил-СоА є попередником жирних кислот і холестеролу, а 3-гліцерофосфат – попередником гліцеролу гліцерофосфоліпідів і триацилгліцеролів. Одночасно питання впливу гіперхолестеринемії на синтез холестеролу і фракційний склад ліпідів у такому холестериногенному і ліпогенному органі як головний мозок, а також роль різних субстратів у забезпеченні цих процесів майже не вивчено

Відомо що, попередником ацетил-СоА, який використовується в синтезі жирних кислот і холестеролу в організмі тварин є, з одного боку, глюкоза, з другого – жирні кислоти, з третього – амінокислоти. Як відомо, кінцевим продуктом катаболізму ряду амінокислот (лізину, триптофану, фенілаланіну, лейцину) в організмі тварин є ацетил-СоА, який використовується в синтезі жирних кислот і холестеролу [4]. Разом з тим, ацетил-СоА утворюється в процесі катаболізму амінокислот (цистеїну, гліцину, серину, треоніну), з яких утворюється піруват. У процесі катаболізму інших амінокислот утворюються інтермедіати циклу трикарбонових кислот, які використовуються в синтезі жирних кислот у значно меншій кількості. Загалом, амінокислоти вносять значний вклад у субстратне забезпечення синтезу ліпідів в організмі тварин [1]. Фонд основних попередників ацетил-СоА (глюкози, жирних кислот, амінокислот) в

органах і тканинах тварин залежить від особливостей метаболізму в них вуглеводів, білків і ліпідів. Ці процеси знаходяться під контролем гормональних і субстратних механізмів регуляції метаболізму [5].

Для з'ясування окремих біохімічних механізмів, які лежать в основі впливу екзогенного холестеролу на обмін ліпідів в головному мозку **метою нашого дослідження** було визначення використання як попередника мічених радіоактивним карбоном глюкози, лізину і пальмітинової кислоти в синтезі жирних кислот, холестеролу і інших класів ліпідів у головному мозку білих щурів і морських свинок *in vitro*. При обранні такої схеми досліджень ми враховували особливості метаболізму ліпідів і ліпопротеїнів у морських свинок, порівняно із білими щурами [8]. У морських свинок, так само як і у людини, більшість циркулюючого холестеролу знаходиться у ліпопротеїнах низької щільності, а вміст вільного холестеролу у печінці в них значно більший, ніж вміст етерифікованого холестеролу [10]. У морських свинок, подібно до людини, однакове співвідношення окремих класів ліпопротеїнів у плазмі крові і подібний вплив його на розвиток холестеринових бляшок в аорті, а також приблизно однаковий ступінь синтезу і катаболізму холестеролу [8].

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проведені на 2-х групах самців морських свинок масою 360-380г і 2-х групах самців білих щурів масою 180-200г, по 4 голови в кожній, які утримувались у віварії. Тваринам 1-ї (контрольної) групи обох видів згодовували стандартний раціон. У тварин 2-ї (дослідної) групи викликали гіперхолестеринемію шляхом додавання до згодовуваного їм раціону холестеролу у кількості 300 мг/кг живої маси на добу. Тривалість досліду 30 днів. Після закінчення досліду тварин обох груп забивали шляхом декапітації під ефірним наркозом, а одержані від них зразки головного мозку використовували у дослідженнях. Зрізи головному мозку розміром приблизно 1x1x1 мм в кількості 100 мг переносили в інкубаційні посудинки з фосфатним буфером Кребс-Рінгера (відношення маси тканин до об'єму буферу – 1:10, рН – 7,5, газова фаза – повітря), до якого додавали 1мкКюрі [$6\text{-}^{14}\text{C}$] глюкози, [$2\text{-}^{14}\text{C}$] лізину або [$1\text{-}^{14}\text{C}$] пальмітинової кислоти [3] і інкубували їх протягом 60-ти хвилин в ультратермостаті при температурі 38 С при постійному перемішуванні [2]. Після закінчення інкубації суспензію центрифугували. Осад промивали 10 мл дистильованої води для видалення залишків ізотопу і знову осаджували центрифугуванням [2]. З відмитого осаду ліпіди екстрагували сумішшю хлороформ-метанолу (2 : 1, за об'ємом) методом Фолча [9], після чого їх фракціонували на класи методом тонкошарової хроматографії на силікагелі в системі гексан - діетиловий ефір - льодова оцтова кислота (співвідношення 70 : 30 : 1 відповідно) [2] та визначали їх радіоактивність на рідинному сцинтиляційному лічильнику Rovetta («ЛКВ», Швеція) у толуоловому сцинтиляторі. Одержані цифрові дані опрацьовували статистично.

Результати досліджень та їх обговорення

Із наведених у таблицях 1-2 даних випливає, що радіоактивність загальних ліпідів при інкубації зрізів головного мозку залежить, з одного боку, від виду тварин, з другого – від попередника синтезу ліпідів, з третього – від екзогенних аліментарних чинників, а саме холестеролу. Так, загальна радіоактивність ліпідів, синтезованих зрізами головного мозку білих щурів дослідної групи з гіперхолестеринемією при інкубації з [$1\text{-}^{14}\text{C}$] пальмітиновою кислотою була в 1,49 раза більшою, а при інкубації з [$6\text{-}^{14}\text{C}$] глюкозою та [$2\text{-}^{14}\text{C}$] лізином – в 15,26 та 1,35 раза меншою, ніж при інкубації зрізів цього органа щурів контрольної групи з відповідними субстратами. У морських свинок загальна радіоактивність ліпідів, синтезованих зрізами головного мозку дослідної групи з гіперхолестеринемією при інкубації з [$1\text{-}^{14}\text{C}$] пальмітиновою кислотою була в 1,72 раза більшою, а при інкубації з [$6\text{-}^{14}\text{C}$] глюкозою та [$2\text{-}^{14}\text{C}$] лізином – в 3,23 та 2,75 раза відповідно меншою, ніж у контрольній групі.

У результаті проведених досліджень встановлена відносно висока радіоактивність загальних ліпідів, холестеролу, триацилгліцеролів, а також інших класів ліпідів при інкубації зрізів головного мозку білих щурів і морських свинок контрольної групи з [$6\text{-}^{14}\text{C}$] глюкозою ($P < 0,05\text{-}0,001$), порівняно до тварин дослідної групи. З цих даних випливає, що у синтезі

жирних кислот і холестеролу у головному мозку морських свинок використовується ацетил-СоА, що утворюється з пірувату, – кінцевого продукту метаболізму глюкози аеробним шляхом. Разом з тим, одержані результати свідчать про використання синтезованих з $[6-^{14}\text{C}]$ глюкози жирних кислот у процесах ацилювання при синтезі триацилгліцеролів і фосфоліпідів, що узгоджується з наявними в літературі даними про інтенсивний синтез жирних кислот і холестеролу у головному мозку *in vitro* при використанні як попередника ліпідів $[6-^{14}\text{C}]$ глюкози або $[3-^{14}\text{C}]$ пірувату [7, 12].

Різке зниження синтезу ліпідів у головному мозку тварин обох видів з гіперхолестеринемією при інкубації з $[6-^{14}\text{C}]$ глюкозою, можна пояснити інгібуючим впливом екзогенного холестеролу на перетворення ацетил-СоА з пірувату, що утворюється в результаті метаболізму глюкози, в жирні кислоти внаслідок інгібування ацетил-СоА-карбоксілази і перетворення його в холестеролу, ймовірно, внаслідок інгібування гідроксиметилглутарил редукази за відомим механізмом зворотнього зв'язку, оскільки ацетил-СоА є попередником жирних кислот і холестеролу [5].

Загальна радіоактивність вільного і етерифікованого холестеролу, синтезованого зрізами головного мозку білих щурів контрольної та дослідної груп при інкубації з $[6-^{14}\text{C}]$ глюкозою, становила відповідно 45,9% та 54,1%; радіоактивність триацилгліцеролів – відповідно 27,7% і 10,3% загальної радіоактивності синтезованих ліпідів. З цих даних випливає, що за умов *in vitro* у головному мозку має місце інтенсивний синтез холестеролу з ацетил-СоА, що утворюється в результаті метаболізму глюкози.

Таблиця 1

Радіоактивність ліпідів (β -розпадів/хв на 100 мг сирової маси) в гомогенатах головного мозку білих щурів за гіперхолестеролемії після інкубації з різними попередниками їхнього синтезу ($M \pm m, n=4$)

Ліпиди	Попередники синтезу ліпідів					
	$[6-^{14}\text{C}]$ глюкоза		$[1-^{14}\text{C}]$ пальмітинова кислота		$[2-^{14}\text{C}]$ лізин	
	Контрольна група	Дослідна група	Контрольна група	Дослідна група	Контрольна група	Дослідна група
Фосфоліпиди	1526±93	93±4*	488±33	1031±64*	434±29	188±12*
Моно-і диацилгліцероли	910±66	159±5*	479±22	636±32*	318±19	176±14*
Вільний холестерол	1233±81	365±21	519±41	635±29	303±23	543±38*
Вільні жирні кислоти	4826±355	72±6*	770±53	1322±77*	543±37	460±30
Триацилгліцероли	3878±279	95±6*	813±29	1546±98*	802±54	706±57
Етерифікований холестерол	1589±102	130±5*	1066±54	988±79	546±35	113±7*
Загальні ліпиди	13962±825	915±58*	4137±219	6178±403*	2947±181	2189±143*

Примітка. в цій і наступній таблиці * - $P < 0,05$, порівняно з контрольними тваринами.

Таким чином, синтез всіх класів ліпідів у головному мозку білих щурів і морських свинок з гіперхолестеринемією при інкубації з $[6-^{14}\text{C}]$ глюкозою в декілька разів зменшується, а при інкубації їх з $[1-^{14}\text{C}]$ пальмітиновою кислотою істотно не змінюється або підвищується. Ці дані свідчать про різниці в ступені використання ацетил-СоА, що утворюється в результаті β -окиснення жирних кислот, і ацетил-СоА, котрий утворюється в результаті декарбоксілювання піровиноградної кислоти, в забезпеченні літогенезу у головному мозку. Очевидним також є регуляторний вплив холестеролу при підвищенні його рівня в клітинах органів і тканин тварин на синтез жирних кислот і холестеролу, який реалізується при дії його на утворення ацетил-СоА або на його перетворення на початкових стадіях синтезу жирних кислот і холестеролу.

Разом з тим, одержані нами результати свідчать про значне використання $[1-^{14}\text{C}]$ пальмітинової кислоти у синтезі фосфоліпідів і триацилгліцеролів та етерифікації холестеролу в головному мозку білих щурів і морських свинок *in vitro*. Вони становлять інтерес у зв'язку з

тим, що за умов *in vitro* у синтезі вказаних ліпідів в головному мозку білих щурів використовуються лише жирні кислоти, синтезовані *de novo* [12], оскільки вільні жирні кислоти крові не проникають у мозок через гематоенцефалічний бар'єр. В умовах *in vitro* [^{14}C] пальмітинова кислота як показали наші дослідження використовується в синтезі ліпідів і піддається β -окисненню.

З наведених у таблиці 1 даних видно, що при інкубації зрізів головного мозку білих щурів контрольної групи з [^{14}C] лізином радіоактивність синтезованих фосфоліпідів, моно- і діацилгліцеролів, вільного холестеролу, вільних жирних кислот, триацилгліцеролів і етерифікованого холестеролу становила відповідно 14,7; 10,7; 14,2; 18,4; 27,1; 18,5 % від загальної радіоактивності синтезованих ліпідів.

З наведених у таблиці 2 даних видно, що ацетил-СоА, котрий утворюється в результаті катаболізму [^{14}C] лізину в головному мозку морських свинок контрольної групи, використовується у синтезі холестеролу і жирних кислот, а останні використовуються у синтезі всіх класів ліпідів, особливо, фосфоліпідів і триацилгліцеролів. Так, радіоактивність фосфоліпідів, синтезованих зрізами головного мозку морських свинок контрольної групи при інкубації з [^{14}C] лізином становила 27,2%, диацилгліцеролів + холестеролу 18,3 %, вільних жирних кислот – 15,1 %, триацилгліцеролів – 24,7 %, етерифікованого холестеролу – 18,5 % від радіоактивності загальних ліпідів.

Таблиця 2

Радіоактивність ліпідів (β -розпадів/хв на 100 мг сирової маси) в гомогенатах головного мозку досліджуваних морських свинок за гіперхолестеролемією після інкубації з різними попередниками їхнього синтезу ($M \pm m$, $n=4$)

Ліпіди	Попередники синтезу ліпідів					
	[^{14}C] глюкоза		[^{14}C] пальмітинова кислота		[^{14}C] лізин	
	Контроль-на група	Дослідна група	Контрольна група	Дослідна група	Контрольна група	Дослідна група
Фосфоліпіди	1980±124	786±46*	1695±44	1780±108	1011±77	472±45*
Моно- і диацилгліцероли + вільний холестерол	1133±92	456±34*	874±76	948±57	844±63	392±29*
Вільні жирні кислоти	1314±84	522±50*	722±30	4508±292*	1620±89	720±46*
Триацилгліцероли	2750±189	446±23*	1614±103	1404±77*	2415±144	456±33*
Етерифікований холестерол	1417±99	424±30*	949±60	1012±66	729±59	368±23*
Загальні ліпіди	8504±607	2634±183*	5854±404	10052±701*	6619±457	2408±174*

Інтенсивність синтезу ліпідів у головному мозку морських свинок з гіперхолестеринемією при використанні як попередника ліпідів [^{14}C] лізину значно знижується, порівняно із інтенсивністю їх синтезу в головному мозку тварин контрольної групи. Інгібуючий вплив гіперхолестеринемії на синтез всіх класів ліпідів у головному мозку морських свинок зумовлений, насамперед, її впливом на синтез жирних кислот. Представлені у таблиці 2 дані показують що, радіоактивність фосфоліпідів, діацилгліцеролів + холестеролу, вільних жирних кислот, триацилгліцеролів і етерифікованого холестеролу, синтезованих зрізами головного мозку морських свинок дослідної групи при інкубації з [^{14}C] лізином, була меншою відповідно в 1,27; 1,37; 1,12; 1,58 і 1,35 рази ($P<0,05$; $P<0,05$; $P<0,5$; $P<0,01$; $P<0,05$), порівняно із тваринами контрольної групи. Зниження синтезу ліпідів у головному морських свинок з гіперхолестеринемією при використанні як попередника ліпідів [^{14}C] лізину узгоджуються з результатами, одержаними в досліді на білих щурах із гіперхолестеринемією. Це можна пояснити інгібуючим впливом холестеролу на утворення ацетил-СоА не тільки з пірувату, що утворюється в результаті метаболізму глюкози, а й на утворення ацетил-СоА, що утворюється з лізину в результаті його катаболізму. Ці дані

становлять інтерес у зв'язку з відсутністю в літературі даних про роль механізму зворотного зв'язку в регуляції утворення ацетил-CoA в результаті катаболізму амінокислот.

Висновки

1. Радіоактивність загальних ліпідів при інкубації зрізів головного мозку залежить, з одного боку, від виду тварин, з другого – від попередника синтезу ліпідів, з третього – від рівня екзогенного холестеролу в раціоні.
 2. Загальна радіоактивність ліпідів, синтезованих зрізами головного мозку білих щурів після навантаження холестеролом при інкубації з $[1-^{14}\text{C}]$ пальмітиновою кислотою була в 1,49 раза більшою, а при інкубації з $[6-^{14}\text{C}]$ глюкозою та $[2-^{14}\text{C}]$ лізином – в 15,26 та 1,35 раза відповідно меншою, ніж у щурів контрольної групи.
 3. Загальна радіоактивність ліпідів, синтезованих зрізами головного мозку морських свинок після навантаження холестеролом при інкубації з $[1-^{14}\text{C}]$ пальмітиновою кислотою була в 1,72 раза більшою, а при інкубації з $[6-^{14}\text{C}]$ глюкозою та $[2-^{14}\text{C}]$ лізином – в 3,23 та 2,75 раза відповідно меншою, ніж при інкубації зрізів цього органа морських свинок контрольної групи.
 4. За умов *in vitro* в головному мозку білих щурів та морських свинок з гіперхолестеринемією активується використання пальмітату та неспецифічно пригнічується окисний метаболізм глюкози та лізину, спрямований на літогенез.
1. Бродін С.В. Використання амінокислот у синтезі ліпідів у тканинах тварин / Бродін С.В., Янович В.Г., Корняк С.Б. // Біологія тварин. — 1999. — Т. 1, № 2. — С. 54—61.
 2. Кейтс М. Техника липидологии / М. Кейтс. — М.: — Мир. — 1975. — 260 с.
 3. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований / Прохорова М.И. – Ленинград: ЛГУ – 1982 – 246с.
 4. Страйер Л. Биохимия: В 3 т. Пер. с англ. / Л. Страйер. — М.: Мир, 1985. — 853 с.
 5. Янович В.Г. Обмен липидов у животных в онтогенезе / В.Г. Янович, П.З. Лагодюк. — М.: Агропромиздат. — 1991. — 316 с.
 6. Dietschy J. M. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal / J. M. Dietschy, S.D. Turley // J. Lipid Res. — 2004. — Vol. 45. — P. 1375—1397.
 7. Edmond J. Dietary cholesterol and the origin of cholesterol in brain of developing rats / [Edmond J., Korsak R.A., Gorrow J.W., Torok-Both J., Catlin D.] // J. Nutr. — 1991. — Vol. 121. — P. 1329—1330.
 8. Fernandez M. L. Guinea pigs: A suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation / M. L. Fernandez, J. S. Volek // Nutrition & Metabolism. — 2006, 3:17. — P. 1743—7075.
 9. Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues / Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. // J. Biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — P.497—509.
 10. Lin E. Dietary fat type and cholesterol quantity interact to affect cholesterol metabolism in guinea pigs / Lin E., Fernandez M. L., McNamara D. J. // J. Nutr. — 1992. — Vol. 122. — P. 2019—2029.
 11. Marbois B. N. The origin of brain of the developing rat / Marbois B.N., Ajie H.O., Korsak R.A., Edmond J. // Lipids. — 1992. — Vol. — P. 587—592.
 12. Matthias Orth. Cholesterol: its regulation and role in central nervous system disorders / Matthias Orth, Stefano Bellosta // Cholesterol. — 2012. — Vol. 17. — P. 2925—98.

О.С. Покотило, М.Д.Кухтин, М.И.Коваль, Т.Я. Ярошенко

Тернопольский национальный технический университет имени Ивана Пулюя

ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского МЗО Украины»

ЛИПОГЕНЕЗ И ХОЛЕСТЕРОЛОГЕНЕЗ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ НАГРУЗКИ ХОЛЕСТЕРОЛОМ

Исследовали *in vitro* интенсивность синтеза липидов различных классов (жирных кислот, холестерина, фосфолипидов и ацилглицеролов) в гомогенатах головного мозга после однократной ежедневной в течение 30 суток нагрузки белых крыс и морских свинок холестеролом (300 мг/кг массы тела). Для этого гомогенаты головного мозга, инкубировали отдельно с $[6-^{14}\text{C}]$ глюкозой, $[2-^{14}\text{C}]$ лизином и $[1-^{14}\text{C}]$ пальмитиновой кислотой и определяли

радиоактивность липидных фракций. Установлено ингибирующее влияние холестерина при повышении его уровня в рационе белых крыс и морских свинок на синтез жирных кислот, холестерина и других классов липидов в головном мозге при использовании в качестве предшественника липидов [6-¹⁴C] глюкозы и [2-¹⁴C] лизина и отсутствие ингибирующего влияния холестерина при инкубации с [1-¹⁴C] пальмитиновой кислотой.

Ключевые слова: липиды, холестерол, морские свинки, крысы, головной мозг, гиперхолестеролемиа

O.S. Pokotylo, M.D.Kuchtyl, M.I.Koval, T.Ya.Yaroshenko

Ivan Pul'uj Ternopil National Technical University, Ukraine

Horbachevsky Ternopil State Medical University, Ukraine

LIPOGENESIS AND CHOLESTEROLOHENESIS IN THE BRAIN OF LABORATORY ANIMALS AT CHOLESTEROL LOADING

Intensity of fatty acids and separate classes of lipids synthesis was studied in vitro in the brain of white rats and guinea pigs loaded by cholesterol in the dose of 300 mg / kg body weight once a day during 30 days by incubation of organ homogenate with [6-¹⁴S] glucose, [2-¹⁴C] lysine, [1-¹⁴C] palmitic acid with following determination of radioactivity of fatty acids, phospholipids, cholesterol, acylglycerols. The inhibition of fatty acids and selected classes of lipids synthesis in vitro in the brain of white rats and guinea pigs loaded by cholesterol at the use of [6-¹⁴S] of glucose and [2-¹⁴C] lysine, as predecessors of stimulation of lipids synthesis at the use of [1-¹⁴C] palmitic acid was established.

Keywords: lipids, cholesterol, guinea pigs, rats, brain, hypercholesterolemia

Рекомендує до друку

Надійшла 18.11.2014

О.Б. Столяр