

••• ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН •••  
••• PHYSIOLOGY OF HUMAN AND ANIMALS •••

УДК: 577.115:577.175.72:612.74

**Влияние калорийно ограниченной диеты на инсулин-индуцированное поглощение глюкозы и содержание липидов в скелетной мышечной ткани 24-месячных крыс**  
Н.А.Бабенко, О.С.Милько

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, НИИ биологии (Харьков, Украина)  
oksana.milko@mail.ru*

Целью данной работы было исследование влияния калорийно ограниченной диеты (КОД) на инсулин-индуцированное поглощение глюкозы и содержание нейтральных липидов и фосфолипидов в длинном разгибателе пальцев (ДРП) и камбаловидной мышце (КМ) 24-месячных крыс. Установлено, что под действием КОД в КМ наблюдается повышение содержания фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, а также снижение уровня свободных жирных кислот, триацилглицеролов, диацилглицеролов и холестерина. Было отмечено, что КОД вызывает повышение инсулин-индуцированного поглощения глюкозы в ДРП опытных крыс в сравнении с контролем. Применение КОД приводит к модуляции инсулин-стимулированного поглощения глюкозы в скелетной мышечной ткани крыс, параллельно снижая содержание липидов, участвующих в нарушении трансдукции сигнала инсулина. Полученные результаты могут свидетельствовать о протекторной роли КОД при возраст-индуцированных нарушениях сигналинга инсулина и содержания нейтральных липидов и фосфолипидов в тканях мишенях действия гормона.

**Ключевые слова:** камбаловидная мышца, длинный разгибатель пальцев, калорийно ограниченная диета, поглощение глюкозы, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, свободные жирные кислоты, триацилглицеролы, диацилглицеролы, холестерин.

**Вплив калорійно обмеженої дієти на інсулін-індуковане поглинання глюкози та вміст ліпідів в скелетній м'язовій тканині 24-місячних щурів**  
Н.О.Бабенко, О.С.Мілько

Метою даної роботи було дослідження впливу калорійно обмеженої дієти (КОД) на інсулін-індуковане поглинання глюкози та вміст нейтральних ліпідів й фосфоліпідів в довгому розгиначі пальців (ДРП) й камбалоподібному м'язі (КМ) 24-місячних щурів. Встановлено, що при дії КОД в КМ спостерігається підвищення вмісту фосфатидилхоліну та фосфатидилетаноламіну, а також зниження рівнів вільних жирних кислот, триацилглицеролів, діацилглицеролів й холестерину. Було відмічено, що КОД викликає підвищення інсулін-індукованого поглинання глюкози в ДРП дослідних щурів в порівнянні з контролем. Застосування КОД призводить до модуляції інсулін-стимульованого поглинання глюкози в скелетних м'язах щурів, паралельно знижуючи вміст ліпідів, що беруть участь в порушенні трансдукції сигналу інсуліну. Отримані результати можуть засвідчувати протекторну роль КОД при вік-індукованих порушеннях сигналінгу інсуліну та вмісту нейтральних ліпідів і фосфоліпідів в тканинах-мішенях дії гормону.

**Ключові слова:** камбалоподібний м'яз, довгий розгинач пальців, калорійно обмежена дієта, поглинання глюкози, фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін, вільні жирні кислоти, триацилглицероли, діацилглицероли, холестерин.

**Effects of a calorie restricted diet on the insulin-stimulated glucose uptake and content of lipids in skeletal muscle of 24-month-old rats**  
N.A.Babenko, O.S.Milko

The aim of this work was to investigate the effect of calorie restricted diet (CRD) on insulin-stimulated glucose uptake and content of neutral lipids and phospholipids in soleus muscle (SM) and extensor digitorum longus (EDL) of 24-month-old rats. CRD increased the content of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine and reduced the levels of free fatty acids, triacylglycerols, diacylglycerols and cholesterol in SM of rats. CRD

increased the insulin-stimulated glucose uptake in EDL of experimental rats versus control group. Application of CRD resulted in modulation of insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle of rats with parallel reduction of lipids involved in insulin signaling. The results obtained might indicate the protective role of CRD in age-related disorders of insulin signaling pathway.

**Key words:** *soleus muscle, extensor digitorum longus, calorie restricted diet, glucose uptake, phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, free fatty acids, triacylglycerols, diacylglycerols, cholesterol.*

### **Введение**

Рядом авторов показано, что применение калорийно ограниченной диеты (КОД) вызывает снижение частоты возникновения возраст-ассоциированных патологий, включающих инсулинорезистентность (Sharma et al., 2012), нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания (Omodei, Fontana, 2011), миопатии (Payne et al., 2003), хроническое воспаление, дислипидемию и митохондриальную дисфункцию (Zheng et al., 2009). При этом сдерживается целый ряд возрастных изменений функциональных параметров организма белых крыс, которые отражаются в длительной задержке роста животных, продлении их жизни (Никитин, 1974) и улучшении когнитивных функций и поведенческих реакций в старости (Babenko, Shakhova, 2012; Шахова та ін., 2012). Недавними исследованиями обнаружено, что в основе развития инсулинорезистентности в гипоталамусе крыс на поздних стадиях онтогенеза лежит специфическое повышение активности тирозин протеинфосфатазы инсулинового рецептора наряду с активацией ингибиторной каппа  $\beta$ -киназы ядерного фактора каппа-В (IKK $\beta$ -NF $\kappa$ B) и протеинкиназы C $\theta$  (PKC $\theta$ ). В то же время отмечено, что КОД вызывает снижение активности тирозин протеинфосфатазы и данных серин/треониновых киназ (García-San Frutos et al., 2012), повышая чувствительность к действию инсулина. Несмотря на большое количество работ, направленных на исследование КОД, молекулярные механизмы реализации эффекта данного экспериментального подхода в трансдукции сигнала инсулина остаются недостаточно изученными. Инсулинорезистентность – комплексное метаболическое нарушение, молекулярные особенности которого еще полностью не расшифрованы. Общая масса скелетных мышц (СМ) составляет ~50% от общей массы тела взрослого человека (Kunihiro, Akihiko, 2012). Кроме того, скелетная мускулатура является основным сайтом инсулин-индуцированного поглощения глюкозы (~80%) (Deng et al., 2012). Известно, что развитие инсулинорезистентности в СМ ассоциировано с целым рядом патологических состояний, таких как сахарный диабет 2 типа (Sayer et al., 2007), ожирение (DeFronzo, Tripathy, 2009), дислипидемия (Prasannarong et al., 2012), сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания (Toth, Tchernof, 2000). Важное место в возникновении состояния резистентности к действию инсулина занимает процесс старения (Prasannarong et al., 2012; De Solís et al., 2012), который сопровождается повышенной аккумуляцией липидов, в частности в эктопических депо, таких как печень, скелетные мышцы и  $\beta$ -клетки поджелудочной железы (Johannsen et al., 2012). В последние годы рядом исследований показано, что в нарушении трансдукции сигнала инсулина и последующем развитии инсулинорезистентности значительное место занимают изменения в метаболизме липидов, которые приводят к накоплению продуктов их обмена, таких как свободные жирные кислоты (СЖК), церамиды (ЦМ) и диацилглицеролы (ДАГ) (Holland et al., 2011; Liang et al., 2013), а также особенности метаболизма фосфолипидов, в частности фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭА) (Fullerton et al., 2009; Walker et al., 2011). Так, отмечено, что ДАГ и ЦМ, индуцируя активацию стрессорных киназ, вызывают снижение инсулин-стимулированного фосфорилирования протеинкиназы B/Akt (Funai et al., 2013), что напрямую связано с нарушением пути сигналинга инсулина. Таким образом, накопление специфических липидных метаболитов в скелетных мышцах может представлять собой общий путь возникновения нарушений в сигналинге инсулина и развития резистентности к действию данного панкреатического гормона.

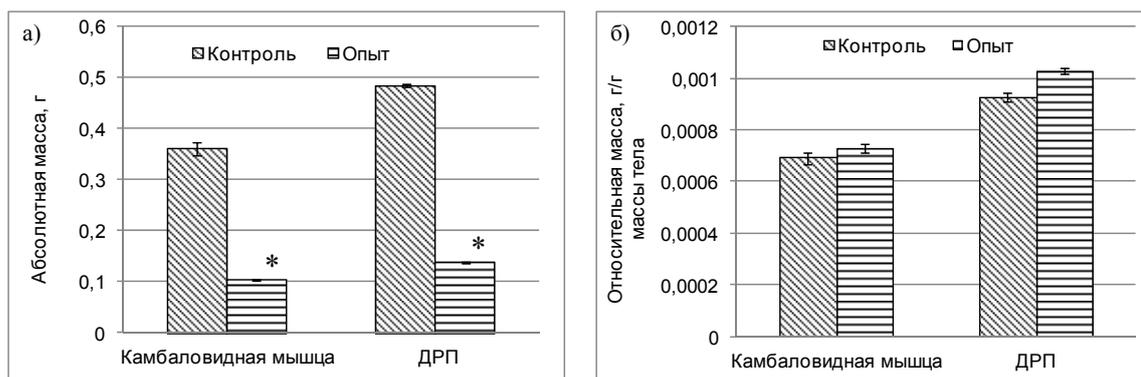
Учитывая немаловажную роль липидов в развитии инсулинорезистентности и сахарного диабета 2 типа, риск возникновения которых значительно повышается на поздних этапах постнатального онтогенеза, и, принимая во внимание малоизученность механизмов действия калорийно ограниченной диеты в процессе сигналинга инсулина, целью настоящей работы было исследование особенностей содержания фосфолипидов (ФЛ) и нейтральных липидов (НЛ) в камбаловидной мышце, а также изучение инсулин-индуцированного поглощения глюкозы в длинном разгибателе пальцев крыс при действии КОД.

### Объекты и методы исследования

Исследования проводили на 24-месячных самцах крыс линии Wistar, получавших стандартный лабораторный рацион питания (контроль) и содержащихся с 1-месячного возраста на периодической калорийно ограниченной диете (опыт) (диета С.М.МсСау в модификации В.Н.Никитина, 1974). И опытных, и контрольных крыс помещали в одной комнате по одному в клетке. Опытные животные получали диету, полноценную по содержанию белков, витаминов и минеральных солей, но резко ограниченную в калорийном отношении, что приводило к существенной задержке роста. Раз в 100 дней давали небольшую подкормку, которая приводила к увеличению их веса на 10 г (Никитин, 1974). С задних конечностей извлекали длинный разгибатель пальцев (ДРП) и камбаловидную мышцу (КМ). С тканей удаляли видимый жир и фасцию. Один из ДРП каждой пары стимулировали инсулином (100 нМ), а другой – 0,9% NaCl, которые добавляли в инкубационную среду (Кребс/бикарбонатный буфер; 37°C, pH 7,5). Через 30 минут после инкубации добавляли [<sup>3</sup>H]-D-глюкозу (0,5 мКи/мл; 10 мин). После включения метки ткань отмывали 0,9% NaCl и лизировали в 1N NaOH (10 мин; 80°C). Радиоактивность меченой [<sup>3</sup>H]-D-глюкозы определяли с помощью счетчика радиоактивности БЕТА. Камбаловидную мышцу замораживали в жидком азоте и гомогенизировали. Липиды из гомогената мышечной ткани экстрагировали по методу Bligh и Dyer (Bligh, Dyer, 1959). Разделение отдельных липидов проводили методом одномерной восходящей хроматографии в тонком слое силикагеля (ЛСЛ 254 – 5/40μ, Сметарол) в системах растворителей: гексан/диэтиловый эфир/ледяная уксусная кислота (73:25:2, об/об) для НЛ, СЖК (Кейтс, 1975); для ФЛ первая система состояла из диэтилового эфира (25 об/об), а вторая – хлороформ/метанол/вода (40:10:1, об/об) (Кейтс, 1975). Пятна липидов проявляли в парах йода и идентифицировали, сравнивая со стандартами. Количественное определение содержания липидов в пробах проводили по методу March и Weinstein (March, Weinstein, 1966), содержание белка – методом Lowry и соавторов (Lowry et al., 1951). Данные в таблице представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка. Для сравнения полученных данных использовали одно- и двухфакторный дисперсионный анализ и t-критерий Стьюдента. Различия между группами считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования было установлено, что при содержании животных на КОД наблюдается достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение как массы тела животных на 74% (контроль,  $520 \pm 12,247$  г; КОД группа,  $134,00 \pm 0,816$  г), так и абсолютной массы исследуемых типов скелетных мышц на 71% (рис. 1, а) по сравнению с контрольной группой животных, что согласуется с работами других исследователей.



**Рис. 1. Влияние калорийно ограниченной диеты на абсолютную (а) и относительную (б) массы скелетных мышц 24-месячных крыс**

*Примечание: \* – достоверно по сравнению с контрольной группой животных,  $p < 0,05$ .*

Так, Rocha и соавторы показали, что содержание крыс на калорийно ограниченной диете приводит к значительному снижению массы тела опытных животных (Rocha et al., 2012). Известно, что такой индекс, как относительная масса органов, занимает важное место в оценке морфофизиологических изменений органов (атрофии, гипертрофии, Vescovo et al., 1998) и является

более точным показателем с учетом осложнений в интерпретации результатов при использовании абсолютной массы органов, обусловленных изменением в массе тела и питанием в опытной и контрольной группах. Нами показано, что достоверных отличий относительной массы, как ДРП, так и КМ не наблюдается (рис. 1, б), что, очевидно, свидетельствует об отсутствии морфологических изменений в СМ опытных животных.

Известно, что применение КОД представляет собой эффективную диетотерапию, оказывающую влияние на продолжительность жизни и сдерживание развития большого количества возраст-ассоциированных патологий, в частности инсулинорезистентности и диабета (Wang et al., 2009; Sharma et al., 2012). Так, отмечено, что ограничение калорийности рациона у мышей отрицательно регулирует IGF1/mTOR сигнальный путь (Masternak et al., 2009), который связывают с процессом старения. Установлено, что mTOR через рибосомальную киназу S6K вызывает фосфорилирование субстрата инсулинового рецептора (IRS) по остаткам серина, блокируя, таким образом, сигналинг данного гормона (Fritsche et al., 2011). Кроме того, показано, что применение КОД, деактивируя mTOR-сигнальный путь, повышает чувствительность к инсулину у мышей (Masternak et al., 2009). Важное место в реализации действия экспериментального калорийно недостаточного питания занимает НАД-зависимая гистон деацетилаза – сиртуин 1 SIRT1), которая вовлечена в регуляцию процессов клеточной дифференциации, апоптоза и старения (Morselli et al., 2010). Установлено, что при КОД повышение экспрессии SIRT1 наблюдается в жировой ткани, печени, почках и мозге крыс (Nisoli et al., 2005). SIRT1 и ее активатор резерватол ингибируют mTOR/S6K путь, в частности, взаимодействуя с белком TSC2, компонентом mTOR ингибиторного комплекса (Morselli et al., 2010). Кроме того, показано, что SIRT1 участвует в регуляции метаболизма. Обнаружено, что в линии мышечных клеток C2C12 SIRT1 активирует коактиватор PGC1 $\alpha$ , который участвует в регуляции ряда генов, вовлеченных в метаболизм липидов (Acadm, Cpt1b и PDK4) (Gerhart-Hines et al., 2007). С другой стороны, отмечено, что активация синтеза PGC1 $\alpha$  индуцирует экспрессию транспортера глюкозы GLUT4 в мышечной клеточной линии C2C12 (Leick et al., 2010), что оказывает положительный эффект на сигналинг инсулина. Рядом авторов обнаружено, что применение КОД улучшает чувствительность к инсулину и повышает уровень инсулин-индуцированного поглощения глюкозы (Zheng et al., 2009; Wang et al., 2009), в частности и в изолированных скелетных мышцах самцов крыс линии Fischer 344xBrown Norway (Sharma et al., 2012).

В данной работе установлено, что периодическое содержание животных на специальном калорийно недостаточном рационе оказывает влияние как на базальный, так и на инсулин-индуцированный уровни поглощения глюкозы в ДРП старых 24-месячных крыс. Обнаружено, что базальный уровень поглощения глюкозы в скелетной мышце опытных крыс повышается в 6,5 раз по сравнению с контрольной группой животных [контроль, 561,268 $\pm$ 2,164 (имп./мин.)/мг; КОД группа, 3689,143 $\pm$ 26,652 (имп./мин.)/мг,  $p < 0,05$ ]. Установлено, что у крыс в условиях экспериментальной диеты наблюдается достоверное повышение инсулин-индуцированного поглощения глюкозы в ДРП по сравнению с таковым показателем в контроле (табл. 1).

Таблица 1.

**Влияние калорийно ограниченной диеты на инсулин-индуцированное поглощение глюкозы в длинном разгибателе пальцев 24-месячных крыс**

Контроль	Опыт
0,361 $\pm$ 0,261	583,121 $\pm$ 11,218*

Примечание: данные представлены как % от инкубации с 0,9% NaCl; \* – достоверно по сравнению с контрольной группой животных,  $p < 0,05$ .

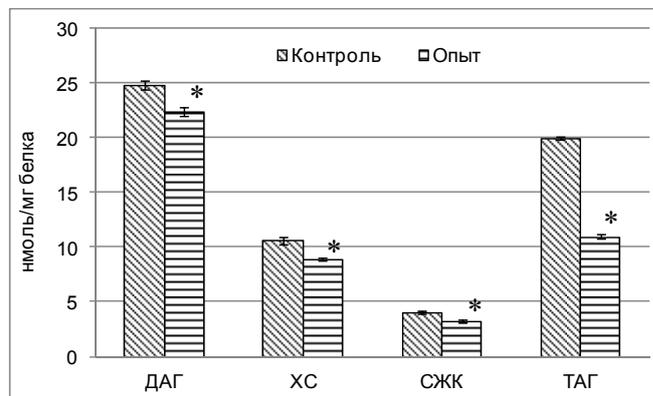
Sharma и соавторы обнаружили, что при КОД в скелетной мышце 9-месячных крыс в условиях экспериментов *ex vivo* в основе повышения чувствительности к инсулину лежит фосфорилирование и активация протеинкиназы B/Akt (Sharma et al., 2012). В то же время, в работе Wang и соавторов отмечено, что повышение чувствительности к действию инсулина у обезьян *Macaca fascicularis* при экспериментальном калорийно ограниченном питании (~30% от стандартного рациона) ассоциировано с фосфорилированием рецептора инсулина и субстрата инсулинового рецептора, а также с повышением активности фосфатидилинозитол-3 киназы (PI3K) в скелетных мышцах опытных животных (Wang et al., 2009). Таким образом, установленное в данной работе повышение инсулин-

индуцированного поглощения глюкозы в СМ опытных крыс, очевидно, обусловлено активацией PI3K-пути. Большим количеством работ последних лет показано, что нарушение пути передачи сигнала инсулина и последующее развитие инсулинорезистентности происходит в условиях нарушения метаболизма липидов и связано с накоплением продуктов их обмена, таких как СЖК, ЦМ и ДАГ (Holland et al., 2011; Liang et al., 2013), а также с особенностями метаболизма фосфолипидов (ФЛ), в частности, фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭА) (Fullerton et al., 2009; Walker et al., 2011). Ранее было установлено, что на поздних стадиях постнатального онтогенеза наблюдается снижение базальных уровней ФЛ и накопление свободных жирных кислот и нейтральных липидов (за счет ди- и триацилглицеролов) в СМ крыс линии Wistar (Бабенко, Тимофийчук, 2012). Эти биологически активные липиды могут принимать участие в регуляции целого ряда молекул, участвующих в трансдукции сигнала инсулина в клетках. Так, отмечено, что повышение содержания СЖК в плазме человека, снижает чувствительность мышечной ткани к инсулину (Boden et al., 2001). СЖК участвуют в процессе инсулин-индуцированного поглощения глюкозы, непосредственно ингибируя сигналинг инсулина в мышечных клетках. Установлено, что инфузия СЖК приводит к снижению IRS-1-ассоциированной фосфатидилинозитол-3-киназной активности и фосфорилирования ПКВ/Akt по остаткам серина в ответ на действие инсулина (Belfort et al., 2005). Кроме того, СЖК могут вызывать нарушение сигналинга данного панкреатического гормона путем индукции повышения уровня ДАГ в первичной культуре мышечных клеток человека (Montell et al., 2001). Предполагают, что повышение уровня ДАГ в скелетной мускулатуре приводит к развитию инсулинорезистентности путем активации ПКК $\theta$ , которая фосфорилирует субстрат инсулинового рецептора (IRS-1), снижая фосфорилирование IRS-1 по остаткам тирозина и блокируя IRS-1-зависимую активность PI3K (Samuel, Shulman, 2012), вызывая тем самым нарушение сигналинга инсулина. В соответствии с этим, Schmitz-Peiffer et al. показали, что при диете с высоким содержанием жиров наблюдается не только повышение концентрации ДАГ, но и активация протеинкиназ в скелетной мускулатуре крыс (Schmitz-Peiffer et al., 1997). Walker и соавторами было установлено, что у *C. elegans* низкая концентрация ФХ в мембране активирует созревание ядерного, транскрипционно активного фактора SREBP-1 (Walker et al., 2011), участвующего в регуляции генов биосинтеза жирных кислот, фосфолипидов, триацилглицеролов (ТАГ) и холестерина (ХС). В печени экспрессия субстрата инсулинового рецептора (IRS-2) негативно коррелирует с активацией SREBP-1 (Tsunekawa et al., 2011), что ведет к развитию инсулинорезистентности. Кроме того, снижение экспрессии СТР-фосфоэтаноламинцитидилтрансферазы (Pcyt2), фермента синтеза ФЭА, наблюдается при развитии инсулинорезистентности, а у Pcyt2<sup>+/-</sup> мышей (с генетически-индуцированной недостаточностью данного фермента) обнаружено снижение чувствительности к инсулину и глюкозе на поздних стадиях развития (Fullerton et al., 2009). В работе (Никитин и др., 1988) установлено, что низкокалорийная диета на протяжении длительного времени способствует сглаживанию возрастных различий в содержании общих фосфолипидов в клетках печени подопытных крыс. Таким образом, учитывая роль липидов в регуляции функционирования системы сигналинга инсулина и роли КОД в сдерживании возраст-ассоциированных изменений обмена липидов, в дальнейшем исследовались особенности содержания ФЛ и НЛ в мышечной ткани крыс, содержащихся на КОД.

В данной работе установлено, что экспериментальная диета приводит к снижению содержания СЖК на 20%, ТАГ на 45%, ДАГ на 10% и ХС на 16% в КМ опытных крыс по сравнению с контролем (рис. 2).

Повышение уровня СЖК в сыворотке крови человека и животных в позднем постнатальном онтогенезе отмечено многими исследователями (Bonadonna et al., 1994; Einstein et al. 2010). Кроме того, обнаружено, что в процессе старения и при инсулинорезистентности (Einstein et al., 2010) наблюдается снижение интенсивности  $\beta$ -окисления жирных кислот в тканях. Также показано повышение с возрастом активности фосфолипазы A<sub>2</sub> (ФЛА<sub>2</sub>) (Petkova et al., 1986), что, наряду с вышесказанным, может являться одним из путей, ведущих к накоплению СЖК в старости. Полученные нами результаты снижения СЖК, ХС, ТАГ в скелетной мышце животных, содержащихся на калорийно ограниченной диете, согласуются с данными других исследователей. Так, Gondret и соавторы продемонстрировали, что применение экспериментальной калорийно ограниченной диеты (~70% от стандартного рациона) снижает содержание нейтральных липидов в скелетных мышцах самцов кроликов линии INRA 1077 (Gondret et al., 2000). Обнаружено, что у мышей, содержащихся на низкокалорийной диете, уровень  $\beta$ -окисления жирных кислот выше по сравнению с контрольной группой животных (Bruss et al., 2010). Кроме того, установлено, что при КОД наблюдается

повышенное содержание глюкокортикоидов, которые участвуют в активации липокортина 1 (аннексина 1), гликозилированного фосфолипид-связывающего белка, ингибирующего активность ФЛА<sub>2</sub> (Kwon et al., 2012), что очевидно, может представлять один из механизмов, отвечающих за снижение содержания СЖК при применении калорийно ограниченной диеты. Wang и соавторы полагают, что повышение уровня СЖК в процессе старения и депонирование их в неадипозных тканях может являться следствием их возрастной резистентности к действию лептина – гормона, регулирующего метаболизм липидов (Wang et al., 2001). Авторы считают, что возраст-ассоциированная резистентность тканей к действию лептина индуцирует аккумуляцию липидов в клетках неадипозных тканей, запуская процесс липотоксичности, что может представлять ключевой этап в развитии инсулинорезистентности (De Solís et al., 2012). Применение калорийно ограниченной диеты (~60% от обычного рациона) повышает чувствительность к данному гормону и экспрессию рецептора лептина ObRb у 3-месячных самцов крыс линии Fischer 344-Brown Norway (Wilsley, Scarpase, 2004), что отражается в нормализации метаболизма липидов и снижении содержания СЖК.



**Рис. 2. Влияние калорийно ограниченной диеты на содержание нейтральных липидов в камбаловидной мышце 24-месячных крыс**

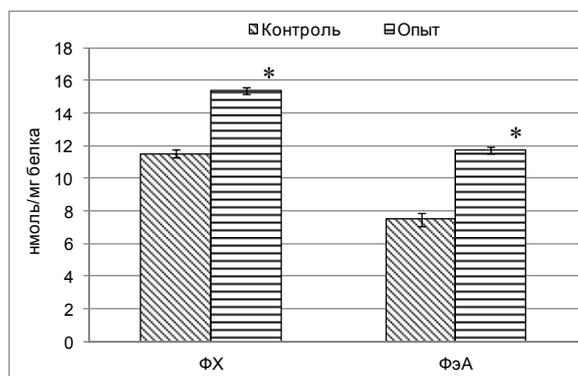
*Примечание: \* – достоверно по сравнению с контрольной группой животных,  $p < 0,05$ .*

Согласно литературным данным, процесс старения также сопровождается повышением содержания XC и его эфиров (Tchkonía et al., 2010) в тканях экспериментальных животных. Важными причинами возрастных нарушений в обмене XC считают значительное снижение экспрессии кавеолина-1 (белка, связывающегося с XC в липидных рафтах и контролирующего внутриклеточный пул данного липида, Bosch et al., 2011), снижение экспрессии рецепторов ЛПНП в печени (Mahley et al., 1981), снижение активности фермента биосинтеза желчных кислот – 7 $\alpha$ -гидролазы (Bertolotti et al., 2007). Jiang и соавторами было показано, что повышение содержания TAG и XC в процессе старения в почках ассоциировано с повышенной экспрессией транскрипционного фактора SREBP-2 и активностью 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктазы (фермента синтеза холестерина и мишени действия SERBP-2 (Jiang et al., 2005) и нивелируется применением экспериментальной калорийно ограниченной диеты у 12- и 24-месячных крыс линии Fischer 344×Brown Norway, что согласуется с полученными нами результатами.

В результате проведенного исследования установлено, что применение экспериментальной диеты вызывает повышение содержания ФХ на 34% и ФЭА на 57% в КМ опытных животных по сравнению с контролем (рис. 3).

Отмечено, что в процессе старения происходит снижение содержания ФХ. Так, показано, что снижение уровня ФХ в составе фосфолипидов (ФЛ) мембран в различных типах клеток и плазме при старении происходит в результате интенсификации процессов перекисного окисления ФЛ, сопровождающегося повышением в мембранах уровня гидропероксида ФХ (Kinoshita et al., 2000). Известно, что применение КОД усиливает процесс биогенеза митохондрий в мышцах путем активации экспрессии PARL – специфической митохондриальной ромбоидной протеазы, вовлеченной в регуляцию функционирования митохондрий, вызывая снижение уровня маркеров оксидативного стресса (Zheng et al., 2009; Omodei, Fontana, 2011), что, очевидно, отражается в снижении продукции

гидропероксида ФХ и нормализации содержания данного липида в СМ. Кроме того, учитывая тот факт, что гидролиз ФХ ФЛА<sub>2</sub> является важным путем катаболизма данного липида (Adibhatla et al., 2006), можно предположить, что ингибирование ФЛА<sub>2</sub> при КОД путем индукции экспрессии липокортин 1 также вносит свой вклад в снижение уровня деградации ФХ и повышение его массы в КМ. Вместе с тем, отмечено, что КОД, применяемая в настоящей работе, приводит к повышению аккумуляции холин-содержащих ФЛ (ФХ и сфингомиелина) в структурах головного мозга крыс, что отражается в улучшении когнитивных функций опытных животных (Babenko, Shakhova, 2012).



**Рис. 3. Влияние калорийно ограниченной диеты на содержание фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтанолamina (ФЭА) в камбаловидной мышце 24-месячных крыс**

*Примечание: \* – достоверно по сравнению с контрольной группой животных,  $p < 0,05$ .*

Известно, что Pcyt2 является основным регуляторным ферментом в синтезе ФЭА de novo (Gibellini, Smith, 2010). Сверхэкспрессия Pcyt2 в культуре гепатоцитов приводит к снижению синтеза ДАГ и ТАГ, содержания СЖК, нормализуя при этом процессы синтеза и обмена ФЭА (Fullerton, Bakovic, 2010). Houweling и соавторы показали, что активность Pcyt2 может регулироваться посттрансляционными механизмами через стимуляцию AMP-активируемой протеинкиназы (AMPK) (Houweling et al., 2002), активность которой повышается при КОД. Кроме того обнаружено, что активность Pcyt2 снижается в случае пальмитат-индуцированной инактивации AMPK (Wen et al., 2011). Также установлено, что в регуляции экспрессии гена Pcyt2 задействованы деацетилазы, в том числе и SIRT1 – гистон деацетилаза, участвующая в регуляции метаболизма при КОД (Swiss et al., 2011). Учитывая все вышеизложенное, апрегуляция Pcyt2, очевидно, может представлять собой механизм, отвечающий за повышение содержания ФЭА в скелетной мышечной ткани опытных животных при применении КОД.

Учитывая то, что с возрастом происходит аккумуляция СЖК и НЛ в сыворотке и диафрагме старых крыс (Бабенко, Тимофийчук, 2012), а применение КОД приводит к нормализации содержания липидов печени, эпидимальной жировой ткани и сыворотки крови 24-месячных крыс до уровня 3-месячных животных (Никитин, Бабенко, 1990), можно предположить, что в условиях низкокалорийной диеты в скелетной мышечной ткани также наблюдается нормализация липидного обмена и активация ряда механизмов, задействованных в сдерживании развития возраст-ассоциированных патологий, таких как инсулинорезистентность и диабет. Таким образом, установлено, что в КМ 24-месячных крыс, содержащихся на КОД, происходит повышение содержания ФХ, ФЭА и снижение уровня СЖК, ДАГ, ТАГ, ХС. Также было отмечено, что при действии КОД в ДРП наблюдается повышение инсулин-индуцированного поглощения глюкозы. Это может быть связано с изменением содержания СЖК в скелетной мышечной ткани, которые являются предшественниками в синтезе липидов, участвующих в сигналинге инсулина. Кроме того, применение КОД приводит к активации протекторных механизмов как на уровне регуляции ферментов, участвующих в метаболизме биологически активных липидов, так и путем модуляции обмена липидов на транскрипционном уровне, что коррелирует с нормализацией функционирования системы сигналинга инсулина. Таким образом, механизм, лежащий в основе повышения чувствительности скелетной мышечной ткани к действию инсулина при применении КОД, вероятно, включает в себя модуляцию содержания липидных мессенджеров, вовлеченных в развитие инсулинорезистентности в старости.

## Список литературы

- Бабенко Н.А., Тимофійчук О.А. Возрастные особенности содержания фосфолипидов, свободных жирных кислот и нейтральных липидов в сыворотке крови и скелетной мускулатуре самцов крыс линии Wistar // Вісн. Харк. ун-ту ім. В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2012. – Вып.15, №1008. – С. 192–202. /Babenko N.A., Timofiychuk O.A. Vozrastnyye osobennosti soderzhaniya fosfolipidov, svobodnykh zhirnykh kislot i neytralnykh lipidov v syvorotke krovi i skeletnoy muskulature samtsov kryis linii Wistar // Visn. Khark. un-tu im. V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2012. – Vyp.15, №1008. – S. 192–202./
- Кейтс М. Техника липидологии. – М.: Мир, 1975. – 322с. /Keyts M. Tekhnika lipidologii. – M.: Mir, 1975. – 322s./
- Никитин В.Н., Бабенко Н.А., Басанец Л.М. Липиды печени белых крыс разного возраста в норме и при периодической калорийно недостаточной диете // Вестн. Харьк. ун-та. – 1988. – №313: Пробл. физиол. и биохимии, онтогенеза и физиол. генетики. – С. 3–5. /Nikitin V.N., Babenko N.A., Basanets L.M. Lipidy pecheni belykh kryis raznogo vozrasta v norme i pri periodicheskoy kaloriyno nedostatochnoy diyete // Vestn. Khark. un-ta. – 1988. – №313: Probl. fiziol. i biokhimii, ontogeneza i fiziol. genetiki. – S. 3–5./
- Никитин В.Н., Бабенко Н.А. О роли липидов в механизме действия калорийно ограниченной диеты на продолжительность жизни // Геронтология и гериатрия. Превентивная геронтология и гериатрия. – К., 1990. – С. 41–48. /Nikitin V.N., Babenko N.A. O roli lipidov v mekhanizme deystviya kaloriyno ogranichennoy diyety na prodolzhitel'nost zhizni // Gerontologiya i geriatriya. Preventivnaya gerontologiya i geriatriya. – K., 1990. – S. 41–48./
- Никитин В.Н. О биохимических и эндокринных механизмах экспериментального продления жизни // Проблемы возрастной физиологии, биохимии и биофизики. – К.: Наукова думка, 1974. – С. 186–211. /Nikitin V.N. O biokhimicheskikh i endokrinnykh mekhanizmax eksperimental'nogo prodleniya zhizni // Problemy vozrastnoy fiziologii, biokhimii i biofiziki. – K.: Naukova dumka, 1974. – S. 186–211./
- Шахова О.Г., Краснікова О.М., Бабенко Н.О. Вплив хронічного обмеження калорійності раціону на вікові особливості орієнтувально-дослідницької поведінки щурів // Фізіол. журн. – 2012. – Т.58, №1. – С. 61–67. /Shakhova O.G., Krasnikova O.M., Babenko N.O. Vplyv khronichnogo obmezheniya kaloriynosti ratsionu na vikovi osoblyvosti oriyentuvально-doslidnytskoi povedinky shchuriv // Fiziol. zhurn. – 2012. – T.58, №1. – S. 61–67./
- Adibhatla R.M., Hatcher J.F., Larsen E.C. et al. CDP-choline significantly restores phosphatidylcholine levels by differentially affecting phospholipase A2 and CTP: phosphocholine cytidyltransferase after stroke // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol.281, №10. – P. 6718–6725.
- Babenko N.A., Shakhova E.G. Effects of a calorie-restricted diet on the content of phospholipids in the brain and cognitive functions in rats // Neurophysiology. – 2012. – Vol.44, №3. – P. 201–207.
- Belfort R., Mandarino L., Kashyap S. et al. Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling // Diabetes. – 2005. – Vol.54, №6. – P. 1640–1648.
- Bertolotti M., Gabbi C., Anzivino C. et al. Age-related changes in bile acid synthesis and hepatic nuclear receptor expression // Eur. J. Clin. Invest. – 2007. – Vol.37, №6. – P. 501–508.
- Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol. – 1959. – Vol.37, №8. – P. 911–917.
- Boden G., Lebed B., Schatz M. et al. Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects // Diabetes. – 2001. – Vol.50, №7. – P. 1612–1617.
- Bonadonna R.C., Groop L.C., Simonson D.C. et al. Free fatty acid and glucose metabolism in human aging: evidence for operation of the Randle cycle // Am. J. Physiol. – 1994. – Vol.266, №3. – P. 501–509.
- Bosch M., Marí M., Herms A. Caveolin-1 deficiency causes cholesterol-dependent mitochondrial dysfunction and apoptotic susceptibility // Curr. Biol. – 2011. – Vol.21, №8. – P. 681–686.
- Bruss M., Khambatta C.F., Ruby M.A. et al. Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2010. – Vol.298, №1. – P. 108–116.
- De Solís A.J., Fernández-Agulló T., García-SanFrutos M. et al. Impairment of skeletal muscle insulin action with aging in Wistar rats: role of leptin and caloric restriction // Mech. Ageing Dev. – 2012. – Vol.133, №5. – P. 306–316.
- DeFronzo R.A., Tripathy D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes // Diabetes Care. – 2009. – Vol.32, №2. – P. 157–163.
- Deng Y.T., Chang T.W., Lee M.S. et al. Suppression of free fatty acid-induced insulin resistance by phytopolyphenols in C2C12 mouse skeletal muscle cells // J. Agric. Food Chem. – 2012. – Vol.60, №4. – P. 1059–1066.
- Einstein F.H., Huffman D.M., Fishman S. et al. Aging per se increases the susceptibility to free fatty acid-induced insulin resistance // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. – 2010. – Vol.65, №8. – P. 800–808.
- Fritsche L., Neukamm S.S., Lehmann R. et al. Insulin-induced serine phosphorylation of IRS-2 via ERK1/2 and mTOR: studies on the function of Ser675 and Ser907 // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2011. – Vol.300, №5. – P. 824–836.

- Fullerton M.D., Bakovic M. Complementation of the metabolic defect in CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (Pcyt2)-deficient primary hepatocytes // *Metabolism*. – 2010. – Vol.59. – P. 1691–1700.
- Fullerton M.D., Hakimuddin F., Bonen A. et al. The development of a metabolic disease phenotype in CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase-deficient mice // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol.284. – P. 25704–25713.
- Funai K., Song H., Yin L. et al. Muscle lipogenesis balances insulin sensitivity and strength through calcium signaling // *J. Clin. Invest.* – 2013. – Vol.123, №3. – P. 1229–1240.
- García-San Frutos M., Fernández-Agulló T., Carrascosa J.M. et al. Involvement of protein tyrosine phosphatases and inflammation in hypothalamic insulin resistance associated with ageing: effect of caloric restriction // *Mech. Ageing Dev.* – 2012. – Vol.133, №7. – P. 489–497.
- Gerhart-Hines Z., Rodgers J.T., Bare O. et al. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 $\alpha$  // *EMBO J.* – 2007. – Vol.26, №7. – P. 1913–1923.
- Gibellini F., Smith T.K. The Kennedy pathway – de novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine // *IUBMB Life.* – 2010. – Vol.62. – P. 414–428.
- Gondret F., Lebas F., Bonneau M. Restricted feed intake during fattening reduces intramuscular lipid deposition without modifying muscle fiber characteristics in rabbits // *J. Nutr.* – 2000. – Vol.130, №2. – P. 228–233.
- Holland W.L., Bikman B.T., Summers S.A. et al. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice // *J. Clin. Invest.* – 2011. – Vol.121, №5. – P. 1858–1870.
- Houweling M., Klein W., Geelen M.J. Regulation of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine synthesis in rat hepatocytes by 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) // *Biochem. J.* – 2002. – Vol.362. – P. 97–104.
- Jiang T., Liebman S.E., Lucia M.S. Calorie restriction modulates renal expression of sterol regulatory element binding proteins, lipid accumulation, and age-related renal disease // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2005. – Vol.16, №8. – P. 2385–2394.
- Johannsen D.L., Conley K.E., Bajpeyi S. et al. Ectopic lipid accumulation and reduced glucose tolerance in elderly adults are accompanied by altered skeletal muscle mitochondrial activity // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2012. – Vol.97, №1. – P. 242–250.
- Kinoshita M., Oikawa S., Hayasaka K. et al. Age-related increases in plasma phosphatidylcholine hydroperoxide concentrations in control subjects and patients with hyperlipidemia // *Clin. Chem.* – 2000. – Vol.46, №6. – P. 822–828.
- Kunihiro S., Akihiko Y. Novel intriguing strategies attenuating to sarcopenia // *Journal of Aging Research.* – 2012. – Vol.2012. – P. 1–11.
- Kwon J. H., Lee J. H., Kim K.S. et al. Regulation of cytosolic phospholipase A2 phosphorylation by proteolytic cleavage of annexin A1 in activated mast cells // *J. Immunol.* – 2012. – Vol.188, №11. – P. 5665–5573.
- Leick L., Fentz J., Bienso R.S. et al. PGC-1 $\alpha$  is required for AICAR-induced expression of GLUT4 and mitochondrial proteins in mouse skeletal muscle // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2010. – Vol.299, №3. – P. 456–465.
- Liang H., Tantiwong P., Sriwijitkamol A. et al. Effect of a sustained reduction in plasma free fatty acid concentration on insulin signalling and inflammation in skeletal muscle from human subjects // *J. Physiol.* – 2013. – Vol.591, №11. – P. 2897–2909.
- Lowry O.N., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol.193. – P. 365–375.
- Mahley R.W., Hui D.Y., Innerarity T.L. et al. Two independent lipoprotein receptors on hepatic membranes of dog, swine, and man: apo-B, E and apo-E receptors // *J. Clin. Invest.* – 1981. – Vol.68. – P. 1197–1206.
- March J.B., Weinstein D.B. Simple charring method for determination of lipids // *J. Lipid Res.* – 1966. – Vol.7, №4. – P. 574–580.
- Masternak M.M., Panici J.A., Bonkowski J.A. et al. Insulin sensitivity as a key mediator of growth hormone actions on longevity // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* – 2009. – Vol.64, №5. – P. 516–521.
- Montell E., Turini M., Marotta M. et al. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2001. – Vol.280, №2. – P. 229–237.
- Morselli E., Maiuri M.C., Markaki M. et al. Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy // *Cell Death Dis.* – 2010. – Vol.1. – P. 1–10.

- Nisoli E., Tonello C., Cardile A. et al. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS // *Science*. – 2005. – Vol.310. – P. 314–317.
- Omodei D., Fontana L. Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease // *FEBS Lett.* – 2011. – Vol.585, №11. – P. 1537–1542.
- Payne A.M., Dodd S.L., Leeuwenburgh C. Life-long calorie restriction in Fischer 344 rats attenuates age-related loss in skeletal muscle-specific force and reduces extracellular space // *J. Appl. Physiol.* – 2003. – Vol.95, №6. – P. 2554–2562.
- Petkova D.H., Momchilova A.B., Koumanov K.S. Age-related changes in rat liver plasma membrane phospholipase A2 activity // *Exp. Gerontol.* – 1986. – Vol.21, №3. – P. 187–193.
- Prasannarong M., Vichaiwong K., Saengsirisuwan V. Calorie restriction prevents the development of insulin resistance and impaired insulin signaling in skeletal muscle of ovariectomized rats // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol.1822, №6. – P. 1051–1061.
- Rocha J.S., Bonkowski M.S., Masternak M.M. et al. Effects of adult onset mild calorie restriction on weight of reproductive organs, plasma parameters and gene expression in male mice // *Anim. Reprod.* – 2012. – Vol.9, № 1. – P. 40–51.
- Samuel V.T., Shulman G.I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links // *Cell.* – 2012. – Vol.148, №5. – P. 852–871.
- Sayer A. A., Syddall H.E., Dennison E.M. et al. Grip strength and the metabolic syndrome: findings from the Hertfordshire Cohort Study // *QJM.* – 2007. – Vol.100, №11. – P. 707–713.
- Schmitz-Peiffer C., Browne C.L., Oakes N.D. et al. Alterations in the expression and cellular localization of protein kinase C isozymes epsilon and theta are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the highfat-fed rat // *Diabetes.* – 1997. – Vol.46. – P. 169–178.
- Sharma N., Bhat A.D., Kassa A.D. et al. Improved insulin sensitivity with calorie restriction does not require reduced JNK1/2, p38, or ERK1/2 phosphorylation in skeletal muscle of 9-month-old rats // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2012. – Vol.302, №1. – P. 126–136.
- Swiss V.A., Nguyen T., Dugas J. et al. Identification of a gene regulatory network necessary for the initiation of oligodendrocyte differentiation // *PLoS One* – 2011. – Vol.6, №4. – P.e18088.
- Tchkonina T., Morbeck D.E., Von Zglinicki T. et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence // *Aging Cell.* – 2010. – Vol.9, №5. – P. 667–684.
- Toth M.J., Tchernof A. Lipid metabolism in the elderly // *Eur. J. Clin. Nutr.* – 2000. – Vol.54, №3. – P. 121–125.
- Tsunekawa S., Demozay D., Briaud I. et al. FoxO feedback control of basal IRS-2 expression in pancreatic beta-cells is distinct from that in hepatocytes // *Diabetes.* – 2011. – Vol.60. – P. 2883–2891.
- Vescovo G., Ceconi C., Bernocchi P. et al. Skeletal muscle myosin heavy chain expression in rats with monocrotaline-induced cardiac hypertrophy and failure. Relation to blood flow and degree of muscle atrophy // *Cardiovasc. Res.* – 1998. – Vol.39, №1. – P. 233–241.
- Walker A.K., Jacobs R.L., Watts J.L. et al. A conserved SREBP-1/phosphatidylcholine feedback circuit regulates lipogenesis in metazoans // *Cell.* – 2011. – Vol.147. – P. 840–852.
- Wang Z.Q., Floyd Z.E., Qin J. et al. Modulation of skeletal muscle insulin signaling with chronic caloric restriction in cynomolgus monkeys // *Diabetes.* – 2009. – Vol.58, №7. – P. 1488–1498.
- Wang Z.W., Pan W.T., Lee Y. et al. The role of leptin resistance in the lipid abnormalities of aging // *FASEB J.* – 2001. – Vol.15, №1. – P. 108–114.
- Wen H., Gris D., Lei Y. et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling // *Nat. Immunol.* – 2011. – Vol.12. – P. 408–415.
- Wilsey J., Scarpace P.J. Caloric restriction reverses the deficits in leptin receptor protein and leptin signaling capacity associated with diet-induced obesity: role of leptin in the regulation of hypothalamic long-form leptin receptor expression // *J. Endocrinol.* – 2004. – Vol.181, №2. – P. 297–306.
- Zheng Y., Zhang W., Pendleton E. et al. Improved insulin sensitivity by calorie restriction is associated with reduction of ERK and p70S6K activities in the liver of obese Zucker rats // *J. Endocrinol.* – 2009. – Vol.203, №3. – P. 337–347.

**Представлено: Л.А.Бондаренко / Presented by: L.A.Bondarenko**

**Рецензент: В.В.Мартиненко / Reviewer: V.V.Martynenko**

*Подано до редакції / Received: 28.10.2013*