

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В. Н. КАРАЗІНА

СТОРОЖЕНКО ГАЛИНА ВАЛЕРІЇВНА

УДК 577.125:612.66

**РОЛЬ СФІНГОЛІПІДІВ У ПОРУШЕННІ ОБМІНУ КАРДІОЛІПІНУ ТА
ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ КЛІТИН І ТКАНИН У ПРОЦЕСІ СТАРІННЯ**

03.00.13 – фізіологія людини та тварин

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків – 2019

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Науково-дослідному інституті біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Бабенко Наталія Олексіївна,
Харківський національний університет
імені В. Н. Каразіна
Міністерства освіти і науки України, м. Харків

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Штеменко Наталія Іванівна,
Національний технічний університет
«Дніпровська політехніка»
Міністерства освіти і науки України,
м. Дніпро
професор кафедри хімії

кандидат біологічних наук, доцент
Горбач Тетяна Вікторівна,
Харківський національний медичний
університет
Міністерства охорони здоров'я України,
м. Харків
доцент кафедри біологічної хімії

Захист відбудеться “ 06 ” грудня 2019 року о 13.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 64.051.17 Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, ауд. 7-26

З дисертацією можна ознайомитися в Центральній науковій бібліотеці Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.

Автореферат розісланий “ 05 “ 11 2019 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

М. К. Ковальова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. З віком у клітинах і тканинах тварин відбуваються зміни метаболізму різних груп ліпідів. Одними з таких ліпідів є сфінголіпіди (СФЛ), вікові порушення метаболізму яких асоціюються з виникненням і розвитком цілого ряду патологічних станів: жирової дистрофії печінки, інсулінрезистентності, різних нефропатій, атеросклерозу, синдрому Альцгеймера та інших захворювань (Summers S., 2006; Kasumov T., 2015; Li P., 2013; Kornhuber J., 2015). Крім того, СФЛ є важливими структуроутворюючими ліпідами біологічних мембран, та попередниками активних метаболітів, які грають роль медіаторів клітинних сигналів в процесах проліферації, диференціації та росту клітин, запалення, онкогенезу і старіння (Hannun Y., 2008; Pavoine C., 2009; Liu X., 2006). Критична роль у регуляції клітинних процесів через сигнальний сфінгомієліновий шлях належить саме цераміду (ЦЕР), який будучи вторинним месенджером, модулює фосфорилування різних білків і є індуктором апоптозу (Hannun Y., 2008; Pavoine C., 2009; Liu X., 2006; Tirodkar T., 2012). Відомо, що рівень ЦЕР в клітинах істотно зростає в умовах природного старіння організму. Так, в нашій лабораторії показано накопичення ЦЕР і підвищення співвідношення ЦЕР/сфінгомієлін в клітинах старіючого організму (Babenko N. A., 2010; Babenko N. A., 2016; Garkavenko V., 2012). Однак механізми, якими накопичення ЦЕР призводить до розвитку патологій залишаються недостатньо вивченими (Babenko N. A., 2006; Babenko N. A., 2013). Разом з цим, останнім часом велике значення надається проблемам мітохондріальної дисфункції, як можливої причини виникнення і розвитку ряду серцево-судинних і нейродегенеративних захворювань (Mancuso D., 2009; Puente-Maestu L., 2009; Chen Q., 2012) і передбачається, що ЦЕР може безпосередньо впливати на мітохондрії (МТХ) (Siskind L., 2005; Siskind L., 2006; Garcia-Ruiz C., 1997). Так, загибель клітин при ішемії/реперфузії, при дії фактору некрозу пухлини альфа (TNF- α), Fas-ліганда, етопозиду, ультрафіолетового або іонізуючого випромінювання асоціюють зі збільшенням мітохондріального ЦЕР (Novgorodov S., 2008; Novgorodov S., 2011). Показано також, що селективний гідроліз мітохондріального пулу сфінгомієліну з утворенням ЦЕР при дії бактеріальної сфінгомієлінази на МТХ призводить до апоптозу (Kujjo L., 2012; Patwardhan G. A., 2016; Virbes H., 2001). Ці роботи підкреслюють фізіологічне значення мітохондріальних пулів ЦЕР і сфінгомієліну. Функціонально ЦЕР пригнічують дихальну активність респіраторної ланцюга, і регулюють проникність зовнішньої мембрани МТХ і мітохондріальної пори для цитохрому с, діючи самостійно або разом з білком Вах (Stiban J., 2008). Але питання про шляхи, якими накопичення ЦЕР може призводити до порушення роботи МТХ лишається відкритим. Таким чином, вивчення прямого і опосередкованого впливу ЦЕР на МТХ є ключем у розумінні процесів, що відбуваються в клітинах при порушенні метаболізму і розвитку патологічних станів.

Відомо, що кардіоліпін (КЛ) – специфічний ліпід МТХ, який відіграє важливу роль у функціонуванні дихального ланцюга в клітинах, зв'язуючи цитохром С, 3 і 4 комплекси респіраторного ланцюга (Hoch F., 1992; Hatch G., 1996). Показано, що зниження інтенсивності електрон-транспортного ланцюга МТХ, як

правило, пов'язане зі зменшенням вмісту КЛ (Chicco A., 2007; Claypool S., 2009). Так, падіння рівня цього фосфоліпиду спостерігається при ішемії/реперфузії, гіпотиреозі, окисному стресі, серцевої недостатності (Ott M., 2002; Petrosillo G., 2003; McMillin J., 2002; Webster J., 2005; Monteiro-Cardoso V., 2015; Paradies G., 2004) і може бути однією з ключових причин входження клітини в апоптоз, в той час як підтримка нормального рівня КЛ надає антиапоптогенні ефекти (Petrosillo G., 2008; Piccotti L. 2002; Buratta M., 2008). В той же час встановлено, що КЛ, який в нормі розташований у внутрішній мембрані МТХ, при пошкодженні цих органел екстерналізується в зовнішній шар мембрани МТХ та слугує сигналом до запуску мітофагії (Maguire J., 2017; Nielson J., 2018; Kagan V., 2016; Huang W., 2012; Chu C., 2013). Крім того, рядом робіт продемонстроване, що рівень КЛ знижується при старінні, але в щурів різних ліній цей процес спостерігається у різному віці (Chicco A., 2007; Moghaddas S., 2002).

У зв'язку з віковим накопиченням в тканинах проапоптичного месенджеру – ЦЕР, цікавим здається дослідження моделей, що дозволяють коригувати вміст сфінго- і гліцероліпідів у клітинах і тканинах старіючого організму. Встановлено, що модуляція компонентів сфінгомієлінового циклу за допомогою флавоноїдів (Babenko N. A., 2008) та поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) (Бабенко Н. А., 2008) призводить до нормалізації рівня ЦЕР в умовах вікового і експериментального порушення його вмісту, а також відновлює чутливість клітин до дії гормонів (Babenko N. A., 2012) і сприяє поліпшенню знижених з віком когнітивних функцій (Babenko N. A., 2009; Babenko N. A., 2010).

В той же час немає даних щодо участі накопичення ЦЕР із віком у порушенні метаболізму мітохондріального ліпиду КЛ. З огляду на вищенаведене, метою нашої роботи було дослідження метаболізму КЛ та встановлення взаємозв'язку між вмістом КЛ, ЦЕР і функціональним станом клітин та тканин щурів лінії Вістар.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано у відділі фізіології онтогенезу Науково-дослідного інституту біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна у рамках держбюджетних наукових тем: «Роль ліпідів, які беруть участь у сигнальній трансдукції, в модулюванні процесу старіння» (№ державної реєстрації: 0106U001577, здобувач – виконавець), «Роль метаболітів сфінгомієлінового циклу в розвитку резистентності клітин до дії фізіологічних стимулів у процесі старіння» (№ державної реєстрації: 0111U010555, здобувач – виконавець), «Роль сфінгомієліназ у віковому порушенні функціонального стану клітин і тканин та у розвитку передчасного старіння організму» (№ державної реєстрації: 0115U000489, здобувач – виконавець).

Мета та завдання досліджень. Метою роботи було виявлення і корекція порушень метаболізму КЛ та встановлення взаємозв'язку між вмістом КЛ, ЦЕР і функціональним станом клітин та тканин щурів лінії Вістар. Відповідно до мети були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити вікові особливості вмісту КЛ в мозку і периферичних тканинах щурів.

2. Дослідити ефекти різних препаратів, що індукують накопичення ендогенних ЦЕР, на рівень КЛ в клітинах і тканинах щурів.
3. Вивчити вплив природних і синтетичних екзогенних ЦЕР на метаболізм КЛ в клітинах і тканинах молодих щурів.
4. Дослідити ефекти С16-цераміду на поведінку та вміст КЛ в гіпокампі і корі головного мозку 3-місячних щурів;
5. Вивчити можливості корекції вікових і експериментальних порушень метаболізму КЛ в клітинах і тканинах тварин різного віку;
6. Дослідити ефекти інгібіторів сфінгомієліназ і синтезу ЦЕР на поведінку та вміст КЛ в гіпокампі і корі головного мозку та інших органах та тканинах 24-місячних щурів;
7. Дослідити ефекти екзогенного КЛ на функціональний стан клітин і тканин старих щурів.

Об'єкт дослідження – корекція вікових та експериментальних порушень метаболізму КЛ за допомогою модуляторів вмісту ЦЕР в різних тканинах щурів.

Предмет дослідження – вміст і обмін КЛ в клітинах печінки, серця, гіпокампу і неокортексу щурів у процесі онтогенезу, або при експериментальному зміненні вмісту ЦЕР. Крім того, предметом дослідження є поведінка щурів при віковому або експериментальному порушенні метаболізму КЛ та ЦЕР.

Методи дослідження – дослідження впливу С16-цераміду або N-ацетилцистеїну на особливості поведінки щурів, дії інсуліну на клітини та тканини старих тварин, а також дослідження ефектів різних аліментарних факторів проводили з використанням фізіологічних методів (спостереження за поведінкою тварин, метод хронічного експерименту). Розподіл ліпідів на класи при вивченні їх вмісту та обміну проводили з використанням методу тонкошарової хроматографії; визначення вмісту ліпідів, ферментів і білка в пробах проводили спектрофотометричними методами; при вивченні метаболізму ліпідів застосовували радіоізотопні методи включення ¹⁴C-мічених попередників до складу ендогенних ліпідів. Визначення вмісту КЛ проводили шляхом вимірювання флуоресценції з використанням барвника акридин оранж 10-ноніл броміду або вимірюванням ліпідного фосфору за методом Бартлета. Аналіз отриманих результатів проводився статистичними методами: параметричними (t-критерій Стьюдента - при порівнянні двох груп і дисперсійний аналіз, - з метою множинних порівнянь), і непараметричними (критерії Манна-Уїтні, Крускала-Уолліса, Фрідмана і Уїлкоксона).

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі встановлено значне зниження рівня мітохондріального фосфоліпиду КЛ в серці, печінці та мозку 30-32-місячних щурів лінії Вістар. Отримані в даній роботі результати припускають щільний взаємозв'язок метаболізму СФЛ і КЛ. Так, індукція накопичення ендогенних ЦЕР і вплив на клітини і тканини, екзогенних ЦЕР різної природи призводить до зменшення рівня КЛ і зниження життєздатності клітин. У той час як, інгібітор синтезу ЦЕР – міріюцин дозволяє знизити індуковану доксорубіцином генерацію ЦЕР і нормалізувати вміст КЛ в клітинах молодих щурів. А порушення обміну сфінго- і гліцероліпідів, що викликані етанолом, вдається

коригувати додаванням до харчового раціону кверцетину або ПНЖК риб'ячого жиру на тлі дії етанолу. Крім того, модуляція обміну СФЛ калорійним обмеженням раціону або дією інгібіторів різних ферментів, які каталізують утворення ЦЕР, дозволяють нормалізувати знижений рівень КЛ в клітинах і тканинах старих тварин.

Показано також, що збільшення вмісту ЦЕР у мозку молодих щурів за допомогою введення С16-цераміду приводе до зниження рівня КЛ в гіпокампі та сприяє появі депресивно-подібних особливостей поведінки: ангедонії, зменшенню частоти грумінгу та реакцій догляду за собою, зростанню тривожності. Вікове зниження рівня КЛ у тканинах серця, печінки та мозку 24-місячних щурів вдавалось нормалізувати до рівня 3-місячних тварин введенням N-ацетилцистеїну, який пригнічує активність нейтральної сфінгомієлінази. У той же час після внутрішньоназального введення старим щурам N-ацетилцистеїну – препарату, що дозволяє знизити рівень ЦЕР, також спостерігалось підвищення вмісту КЛ в мозку, а депресивно-подібні ознаки поведінки зникали.

Крім того, встановлено, що додавання екзогенного КЛ до середовища культивування гепатоцитів, м'язової тканини і кори мозку старих щурів призводило до збільшення базального поглинання ними глюкози і синтезу глікогену та підвищення чутливості цих клітин до дії інсуліну. В той же час сполучена дія доксорубіцину або С16-цераміду та КЛ на гепатоцити 3-місячних щурів викликала відновлення функціонального стану клітин, зростання базального та інсулін-стимульованого поглинання глюкози і синтезу глікогену.

Практичне значення одержаних результатів. Отриманні в роботі данні про особливості метаболізму КЛ в клітинах і тканинах щурів з віком та його взаємозв'язку з накопиченням ЦЕР в цих умовах сприяють розширенню уявлення про можливі причини розвитку патологічних станів, асоційованих з дисфункцією МТХ та можуть бути перспективними для пошуку нових шляхів у подоланні вікових патологій. Крім того, отримані дані дозволяють припустити щільний зв'язок між рівнем КЛ та появою депресивно-подібних ознак поведінки щурів. Продемонстровані в даній роботі можливості корекції метаболізму КЛ за допомогою аліментарних факторів або модуляторів обміну СФЛ можуть являти собою основу для пошуку нових лікарських препаратів і сприяти підвищенню ефективності комплексної терапії вік-асоційованих захворювань. Результати дисертаційної роботи впроваджені в навчальний процес кафедри фізіології людини та тварини біологічного факультету у рамках спеціального курсу «Клітинні системи сигнальної трансдукції» для студентів 1-го року навчання в магістратурі кафедри фізіології людини та тварин Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (впровадження підтверджено відповідним актом).

Біоетична експертиза. Роботу з лабораторними тваринами (щурами) проводили відповідно до вимог положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та згідно відповідних Законів України. Комісією НДІ біології порушень при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено (протокол № 5 від 16.05.2019 р.).

Особистий внесок здобувача. Спільно з науковим керівником д.б.н, проф. Бабенко Н. О. обрані об'єкт і предмет дослідження, визначена мета, завдання та тема дисертаційної роботи і проведена інтерпретація отриманих результатів. Автором самостійно проведено аналіз наукової літератури, виконані експериментальні дослідження, проведена статистична обробка отриманих результатів, оформлення і підготовка матеріалів до публікації.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були представлені на науково-практичних конференціях: на науково-практичних конференціях з міжнародною участю «Фундаментальна та клінічна ендокринологія: проблеми, здобутки, перспективи» (Сьомі Данилевські читання та Дванадцяті Данилевські читання), (Харків, 2008, 2013); VI науково-практичній конференції «Валеологія: сучасний стан, напрямки та перспективи розвитку» (Харків, 2008); VIII, IX и X Міжнародних симпозиумах «Біологічні механізми старіння» (Харків, 2008, 2010, 2012); III и IV Міжнародних конференціях молодих вчених «Біологія від молекули до біосфери» (Харків, 2008, 2009); Всеукраїнській конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, 2008); Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології» (Донецьк, 2009); IV Міжнародній конференції молодих вчених “Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution” (Одеса, 2009); XVIII з'їзді Української фізіологічної спілки з міжнародною участю (Одеса, 2010); I Міжнародній науково – практичній інтернет – конференції: Ліпідологія – наука XXI століття (Казань, 2013); XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014); XIX з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. П. Г. Костюка з міжнародною участю (Київ, 2014) та IV Міжнародній науково-практичній конференції «Теорія і практика актуальних наукових досліджень» (Львів, 2017).

Публікації. За темою дисертаційної роботи було опубліковано 24 наукових праці, з яких 8 статей (2 статті у виданнях, які входять до переліку наукових фахових видань України, 3 статті у виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз, 3 статті, які додатково відображають зміст дисертації) та 16 тез доповідей в збірниках матеріалів вітчизняних та міжнародних з'їздів і конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, трьох розділів досліджень, загальних висновків, списку використаних джерел літератури та 2 додатків. Обсяг загального тексту дисертації складає 182 сторінок, з них основного тексту 120 сторінок. Робота проілюстрована 4 таблицями і 30 рисунками. Список використаних джерел містить 318 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність дослідження ролі СФЛ у порушенні обміну КЛ та функціонального стану клітин і тканин у процесі старіння. Крім того, у вступі наведено зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Сформульовано мету, задачі та методи дослідження. Визначено наукову новизну і практичне

значення отриманих результатів. Надано відомості про публікації, особистий внесок здобувача та апробацію результатів дисертації.

В огляді літератури здійснено аналіз першоджерел щодо структури та функціональної ролі КЛ в клітинах і тканинах ссавців. Розглянуто роль КЛ в сигнальній трансдукції та особливості метаболізму цього фосфоліпиду в процесі онтогенезу і при різних патологічних станах. Крім того, проаналізовано наукові джерела щодо ролі СФЛ, а саме ЦЕР, у порушенні функціонального стану клітин і тканин.

Матеріали та методи дослідження. Експерименти виконані на 186 щурах-самцях лінії Вістар 3-, 12-, 24- та 30-32-місячного віку, які утримувались в стандартних умовах віварію Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Всі дослідження на тваринах проводили з дотриманням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів і інших наукових цілей (Страсбург, 1985).

У першій серії експериментів проводили дослідження вмісту КЛ в умовах вікового або експериментального накопичення ЦЕР в клітинах серця, печінки та мозку 3-, 12-, 24- та 30-32-місячних щурів. Накопичення ЦЕР в клітинах та тканинах 3-місячних щурів досягалося збільшенням калорійності харчового раціону насиченими жирами (на 21 %), внутрішньочеревним введенням доксорубіцину 5 мг/кг протягом 4 тижнів до кумулятивної дози 20 мг/кг або введенням внутрішньошлунково 40 % етанолу (10 мл/кг) протягом 7 днів. У другій серії експериментів збільшення вмісту ЦЕР досягалося шляхом введення різних доз (15, 30, 60 мкМ) екзогенних С2-, С16-, або С18-церамідів до клітин та тканин 3-місячних щурів. Для вивчення можливостей корекції зниженого з віком вмісту КЛ використовували експериментальну калорійно-обмежену дієту (КОД) за Маккеєм-Нікітіним (Никитин В., 1991). Крім того, для зниження вмісту ЦЕР, викликаного введенням 40 % етанолу (10 мл/кг), на тлі етанолу внутрішньошлунково вводили n-3 ПНЖК риб'ячого жиру (1 г/100 г маси тіла, протягом 7 днів) або кверцетин (50 мг/кг маси тіла, протягом 7 днів).

У третій серії експериментів досліджували особливості поведінки 3- та 24-місячних щурів в тестах «Відкрите поле», «Темний/світлий відсік», «Перевага до розчину сахарози», «Годування в незнайомій обстановці», «Імобілізація за хвіст» та «Сплеш-тест» при віковому або експериментальному зниженні вмісту КЛ та збільшенні вмісту ЦЕР, шляхом внутрішньоназального введення С16-церамиду (60 мкМ). Крім того, вивчали вміст КЛ, ЦЕР та зміни поведінки 24-місячних щурів, яким протягом 14 днів інтраназально вводили інгібітор накопичення ЦЕР – N-ацетилцистеїн (50 мг/кг). Для вивчення можливості корекції рівню КЛ в тканинах старих щурів використовували препарати іміпрамін (10 мг/кг маси тіла протягом 14 днів), золедронову кислоту (0,150 мг/кг маси тіла через добу протягом 10 днів) або N-ацетилцистеїн (3 мМ/кг маси тіла протягом 18 днів).

Для вивчення ефектів екзогенного КЛ на фізіологічний стан гепатоцитів, мозку та скелетних м'язів (зокрема литкового м'язу) 24-місячних тварин клітини культивували протягом 1 години з екзогенним КЛ (100 нМ) після чого до середовища культивування додавали 10 нМ інсуліну та вивчали транспорт глюкози.

При дослідження сполученої дії КЛ та ЦЕР на фізіологічний стан клітин 3-місячних щурів, гепатоцити, мозок, або литковий м'яз інкубували у присутності С16-цераміду (60 мкМ) протягом 1 години, після чого ще 1 годину з додаванням КЛ (100 нМ) та додавали 10 нМ інсуліну і вивчали транспорт глюкози. Поглинання клітинами глюкози визначали з використанням 2-D-(3H)-глюкози (0,5 мкКі/мл) (Aga-Mizrachi S. et al., 2008). Для вивчення утворення глікогену клітини та тканини культивували 60 хв при 37° С в буфері HBS з 5мМ глюкозою, 10 нМ інсуліном (або 0,9 % NaCl) і 1 мкКі/мл D-(U14C)-глюкозою. Радіоактивність отриманих зразків визначали за допомогою сцинтиляційного лічильника.

Виділення МТХ з серця, печінці та мозку 3- і 24-місячних щурів проводили за методом (Kamath S. et al., 1972) в модифікації (Lemeshko V., 1980). Виділення гепатоцитів 3- та 24-місячних щурів проводили неферментативним методом, як описано у (Петренко А. Ю. та ін., 1991). Гепатоцити ресуспендували в середовищі 199 з 25 мМ HEPES, та інкубували у присутності пальмітинової кислоти (0,75 мМ), доксорубицину (5,2 нМ) та інгібіторів метаболізму СФЛ GW4869 (20 мкМ), іміпраміну (50 мкМ) або міріоцину (5 мкМ) на тлі доксорубицину. Після виділення та закінчення інкубації визначали кількість і життєздатність гепатоцитів (за допомогою 0,4 % розчину трипанового синього та визначення активності лактатдегідрогенази у середовищі інкубації. Після закінчення інкубації реакцію зупиняли холодною сумішшю хлороформ:метанол (1:2, за об'ємом) і проводили екстракцію ліпідів за методом (Bligh E., 1959). Поділ ліпідів на фракції проводили методом тонкошарової хроматографії на сілікагелевих пластинках Sorbfil. Для розподілення КЛ та фосфатидної кислоти (ФК) використовували діетиловий ефір – 1 система та хлороформ/метанол/крижана оцтова кислота/вода (80:25:8:0,3, за об'ємом) – 2 система. Ліпіди виявляли в парах йоду та ідентифікували шляхом порівняння зі стандартами. Вміст КЛ визначали за методом (Bartlett G., 1959) або забарвлюванням флуоресцентним барвником акридин оранж 10-ноніл бромідом, який з високою афінністю зв'язується з КЛ в МТХ (Kaewsuya P., 2007). Для вивчення синтезу КЛ гепатоцити 3-місчних щурів інкубували у присутності попередника синтезу ліпідів [14C]лінолевої кислоти.

Для визначення активності сфінгомеліназ у серцевому м'язі використовували субстрат ферменту — (N-метил-14C)сфінгомелін (58 мКі/мМ). Реакційна суміш для визначення активності кислої сфінгомелінази в серці містила 50 мМ ацетатного буферу (рН 5,0), 1 мМ ЕДТА, 2 мМ (N-метил-14C)сфінгомеліну. Проби інкубували при t 37°С протягом 1 години при постійному перемішуванні. Реакцію зупиняли додаванням 1,5 мл охолодженої суміші хлороформ:метанол (1:2, за об'ємом) з подальшим додаванням 1 мл хлороформу і 1 мл Н₂О. Суміш центрифугували протягом 5 хвилин при 3000 об/хв. Після поділу фаз аліквоти верхньої і нижньої фаз, що містили [14C]фосфорілхолін і [14C]сфінгомелін відповідно, використовували для визначення радіоактивності за допомогою сцинтиляційного лічильника. Активність ферменту виражали в нмоль продукту або субстрату на 1 мг білка за 1 годину.

Для аналізу даних, отриманих у ході скринінгових досліджень при підборі доз і режиму введення модуляторів метаболізму СФЛ і при аналізі результатів

поведінкових тестів щурів використовували непараметричні критерії Манна-Уїтні, Крускала-Уоліса, Фрідмана і Уилкоксона. При вивченні вікових особливостей вмісту ліпідів в різних тканинах щурів для порівняння двох груп використовували параметричний t-критерій Стьюдента. З метою множинних порівнянь в роботі використовували дисперсійний аналіз (ANOVA). Відмінності між групами вважали статистично значущими при $p \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Дослідження вікових особливостей вмісту КЛ в функціонально різних тканинах і органах щурів. Для детального вивчення зміни рівня КЛ в процесі онтогенезу були досліджені тканини молодих статевозрілих (3-місячних), дорослих (12-місячних), старих (24-місячних) і дуже старих (30-32-місячних) щурів. Встановлено, що у 12-місячному віці вміст КЛ в серці знижується на 22 % у порівнянні з 3-місячними щурами (рис.1 А). В подальшому онтогенезі рівень КЛ в серці продовжував знижуватися, і к 24-місячному віку складав лише 45 % від такого у серці 3-місячних тварин (рис. 1 А). Однак, у дуже старих щурів, 30-32-місячного віку вміст КЛ в серці не відрізнявся від рівня цього фосфоліпиду у 24-місячних тварин.

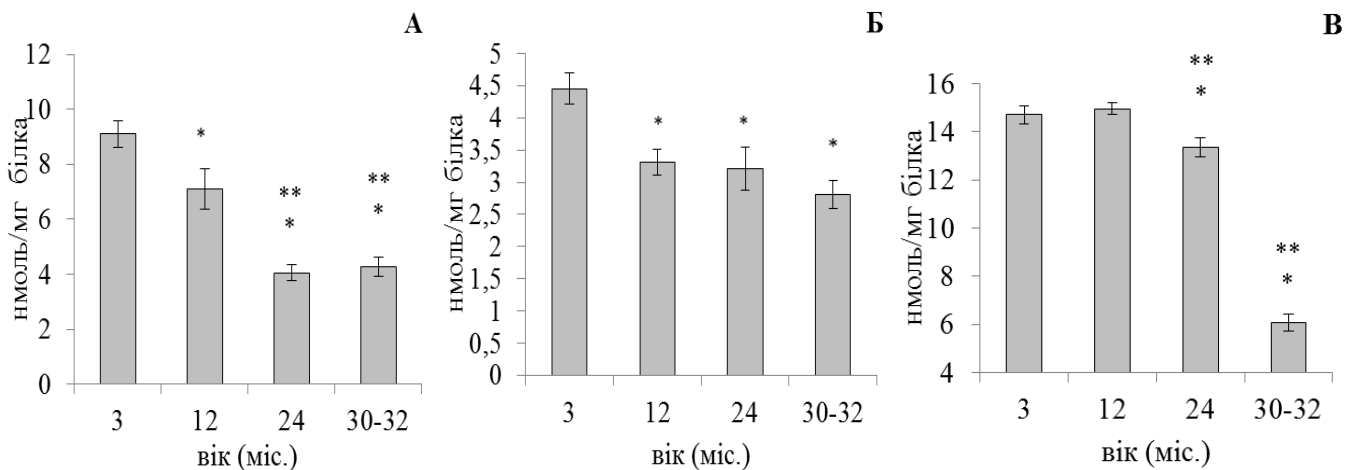


Рис. 1 Вікові особливості вмісту КЛ в серці (А), печінці (Б), та корі мозку (В) щурів лінії Вістар

Примітки: 1) * – $p < 0,05$ у порівнянні з групою 3-місячних щурів; 2) ** – $p < 0,05$ у порівнянні з групою 12-місячних щурів

Якщо у серці вміст КЛ поступово знижувався протягом життя, то в печінці щурів 12-місячного віку рівень КЛ знижується на 25 % у порівнянні з 3-місячними щурами. В подальшому онтогенезі вміст КЛ в печінці лишається на рівні близькому до такого у 12-місячних щурів (рис. 1 Б). Наступним об'єктом нашого дослідження явився мозок, оскільки відомо, що розвиток багатьох нейродегенеративних захворювань щільно пов'язаний із віком. Існує багато доказів того, що дисфункція МТХ та порушення дихальних комплексів у мозку пов'язані з втратою нейронів, та можуть передувати розвитку вік-асоційованих нейродегенеративних захворювань

(Navarro A., 2009). Дослідження зміни вмісту КЛ у мозку в процесі онтогенезу виявило, що на відміну від такого в серці та печінці, вміст КЛ в мозку 12-місячних тварин не відрізняється від рівню цього ліпиду у молодих 3-місячних щурів (рис. 1 В). У старих 24-місячних щурів спостерігалось зниження вмісту КЛ у корі мозку порівняно з 3-місячними щурами (рис. 1 В). Суттєве падіння вмісту КЛ виявлялось в корі мозку 30-32-місячних щурів – на 59 % нижче, ніж в корі мозку 3-місячних тварин (рис. 1 В). У той же час, рівень КЛ в гіпокампі 24-місячних щурів виявився на 25 % нижчим, ніж у 3-місячних щурів.

Крім того, у нашій роботі встановлено вікове зниження рівню КЛ в МТХ серця (на 37 %), печінки (на 54 %) та мозку (на 20 %) 24-місячних щурів лінії Вістар у порівнянні з рівнем КЛ в тканинах 3-місячних тварин. Таким чином, дані отримані з мітохондріальної фракції підтверджують результати дослідження цілої тканини.

Вплив дієтичних факторів та фармакологічних препаратів, що індукують накопичення ЦЕР в клітинах на вміст КЛ в тканинах щурів різного віку. Для встановлення взаємозв'язку між змінами вмісту КЛ та ЦЕР на наступному етапі роботи проведена серія дослідів у яких штучно підвищували рівень ендogenous ЦЕР в клітинах дослідних щурів. В даний час вважається, що багато які сполуки можуть реалізовувати свої ефекти шляхом підвищення рівня ЦЕР та порушення функціонального стану МТХ (Rincheval V, 2012; Bhujade A., 2013). Так, відомо, що препарат доксорубіцин, етанол, пальмитинова кислота та дієти з підвищеним вмістом насичених жирних кислот, а також екзогенне введення ЦЕР може сприяти підвищенню рівня ендogenous ЦЕР в клітинах. В серце і печінці щурів, що отримували ін'єкції доксорубіцину спостерігається зниження рівню КЛ на 25 % (в печінці) і на 28 % (в серці) у порівнянні з контрольними тваринами. Порівнюючи зміни КЛ при дії цитостатику і при природному старінні, можна відзначити, що доксорубіцин викликає зниження рівню КЛ в печінці дослідних тварин до такого в печінці інтактних 24-місячних щурів. В корі мозку піддослідних щурів зміни вмісту КЛ не спостерігалось, можливо внаслідок його не здатності проникати крізь гематоенцефалічний бар'єр. Крім того, при додаванні доксорубіцину до середовища інкубації гепатоцитів 3-місячних щурів встановлено зниження вмісту КЛ на 22 % у порівнянні з контролем, тоді як інгібітор синтезу ЦЕР – міріоцин на тлі дії доксорубіцину підвищував вміст КЛ до рівня ліпиду в контрольних клітинах.

Попередніми дослідженнями встановлено, що утримування тварин на харчовому раціоні, збагаченому насиченими жирами яловичого жиру, супроводжується збільшенням рівня вільних жирних кислот та знов синтезованих ЦЕР у печінці, м'язах і мозку 24-місячних щурів у порівнянні з контрольними тваринами цього ж віку (Vabenko N. A., 2009). Аналіз вмісту гліцерофосфоліпідів в тканинах щурів, які отримували дієту, збагачену насиченими жирними кислотами, виявив зниження вмісту КЛ на 28 % в серці, і на 27 % в печінці щодо щурів, яких утримували на стандартному раціоні (рис. 2). В умовах надмірного надходження в організм вільних жирних кислот активуються шляхи їх метаболізму, такі як синтез ЦЕР *de novo* (Chavez J. A., 2003).

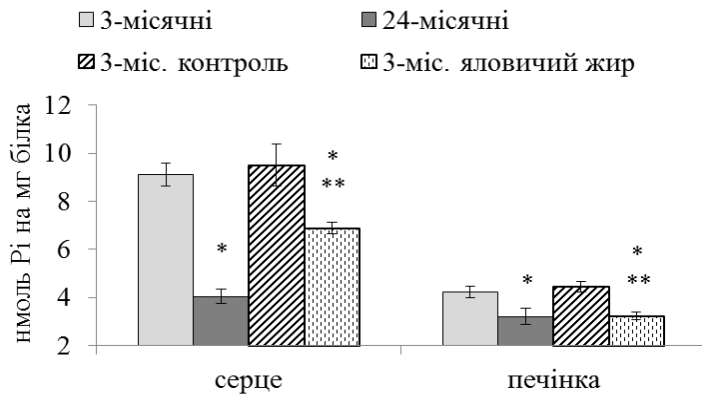


Рис. 2 Вплив насичених жирів дієти на вміст КЛ в різних тканинах 3-місячних щурів

Примітки: 1) * – $p < 0,05$ у порівнянні з групою «3-місячні»; 2) ** – $p < 0,05$ у порівнянні з групою «3-міс. контроль»

Попередніми дослідженнями встановлено, що введення етанолу 3-місячним щурам приводе до збільшення вмісту ЦЕР, зменшенню сфінгомієліну та порушує метаболізм фосфоліпідів у тканинах 3-місячних щурів, викликаючи схожі на вікові зміни ліпідного обміну (Babenko N. A., 2008). Крім того, було показано, що додавання до харчового раціону флавоноїдів (Nielson J. R., 2018) і n-3 ПНЖК (Babenko N. A., 2010) призводить до нормалізації вмісту ЦЕР в умовах вікового та експериментального порушення (Kagan V. E., 2016; Babenko N. A., 2008). Вважається, що модулюючи ефекти дієти, збагаченої n-3 ПНЖК риб'ячого жиру пов'язані зі здатністю цих речовин вбудовуватися у фосфоліпиди та змінювати властивості мембран, а також їхніми антиоксидантними й протизапальними якостями (Nielson J. R., 2018; Babenko N. A., 2008). Корекція вмісту ЦЕР і сфінгомієліну при додаванні кверцетину до раціону тварин, які отримували етанол, обумовлена антиоксидантними властивостями кверцетину і його здатністю вбудовуватися в ліпідний бішар та послаблювати мембранні ефекти етанолу (Nielson J. R., 2018).

Враховуючи можливість моделювання рівню ЦЕР етанолом, n-3 ПНЖК риб'ячого жиру та кверцетином (Nielson J. R., 2018; Kagan V. E., 2016; Babenko N. A., 2008) в даній роботі вивчали вплив ПНЖК риб'ячого жиру та кверцетину на вміст КЛ в печінці та серці молодих щурів в умовах короткострокової дії етанолу. Встановлено, що вміст КЛ в серці та печінці тварин, яким вводили етанол знижувався на 30 % та 38 % відповідно, порівняно з щурами контрольної групи (рис. 3). В той же час, введення етанолу піддослідним тваринам супроводжувалось зростанням рівня ФК у серці (на 43 %) та в печінці (на 74 %) відносно контрольних тварин, які отримували воду. Отримані дані дозволяють припустити, що зміна метаболізму компонентів сфінгомієлінового циклу в клітинах печінки і серця при дії етанолу супроводжувалася зниженням вмісту КЛ і накопиченням ФК. Відомо, що основною причиною зниження КЛ є підсилення його деградації під дією фосфоліпаз, пригнічення синтезу *de novo* в результаті порушення роботи ферментів, що беруть участь у біосинтезі КЛ або зниження біодоступності прекурсорів КЛ. Введення до раціону n-3 ПНЖК риб'ячого жиру або кверцетину сприяло відновленню зниженого дією етанолу рівня КЛ та зменшенню вмісту ФК в печінці та серці піддослідних тварин (рис. 3). Вочевидь, додавання до раціону ПНЖК риб'ячого жиру і кверцетину з одного боку запобігає розвитку оксидативного стресу і утворенню цитокінів і таким чином перешкоджає накопиченню ЦЕР в клітинах і розвитку клітинної дисфункції при дії етанолу, а з

іншого боку додавання до раціону n-3 ПНЖК риб'ячого жиру може активізувати шляхи ремоделювання КЛ та підвищувати рівень цього фосфоліпиду.

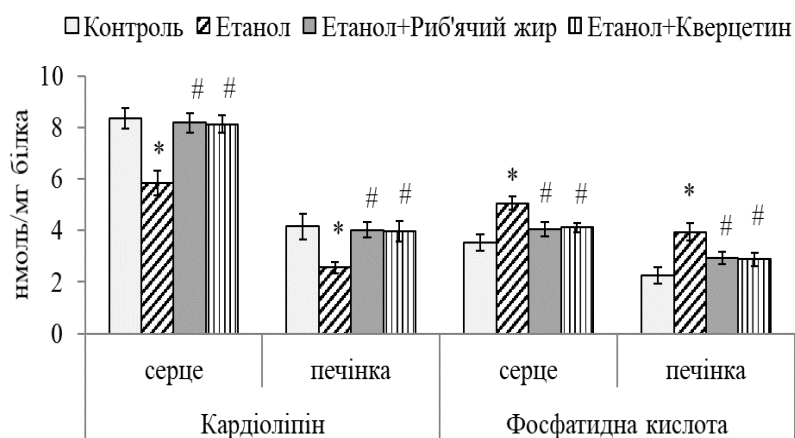


Рис. 3 Ефект етанолу, риб'ячого жиру і кверцетину на вміст КЛ та ФК в тканинах 3-місячних щурів.

Примітки: 1) * – $p < 0,05$ у порівнянні з групою «Контроль»; 2) # – $p < 0,05$ у порівнянні з групою «Етанол»

Враховуючи разом результати, щодо підвищення вмісту ЦЕР в печінці та мозку щурів, що отримували етанол (Babenko N. A., 2008), та дані про пригнічення ЦЕР активності деяких метаболічних шляхів КЛ (Xu F. Y., 1999) та функціонування МТХ (Novgorodov S. A., 2011), можна припустити, що зниження рівня КЛ в печінці та серці щурів при дії етанолу відбувалось внаслідок підвищення рівня ЦЕР в цих тканинах. Відновлення вмісту КЛ і ФК до рівня контрольних тварин при додаванні до харчового раціону кверцетина або n-3 ПНЖК риб'ячого жиру на тлі етанолу відбувалося завдяки здатності цих речовин ефективно знижувати вміст ЦЕР.

Дослідження впливу екзогенних ЦЕР на вміст КЛ в клітинах та тканинах 3-місячних щурів. Експерименти, проведені з синтетичним аналогом ЦЕР – N-ацетил-d-еритро-сфінгозином (C2-церамід), показали, що ЦЕР здатний індукувати загибель клітин, викликаючи міжнуклеосомну деградацію ДНК і деякі морфологічні зміни в структурі клітини (Obeid L. M., 1993).

Встановлено, що інкубація гепатоцитів з довголанцюговими C16- і C18-церамідами (60 μM) призводила до зниження вмісту КЛ на 25 % і 28 % відповідно. У той же час, коротколанцюговий C2-церамід в концентрації 15 μM викликав зниження КЛ на 54 %, а 30 та 60 μM ЦЕР знижував рівень КЛ відповідно на 67 % та 78 % порівняно з контролем. Крім зниження вмісту КЛ при дії екзогенних ЦЕР спостерігалось зменшення включення $[^{14}\text{C}]$ лінолевої кислоти до складу КЛ (рис. 4 А) та життєздатності цих клітин (рис. 4 Б). КЛ набуває характерного складу жирних кислот шляхом пост-синтетичного ремоделювання.

Ремоделювання КЛ залежить від активності ферменту тафаззину – неспецифічної фосфоліпід-лізофосфоліпідтрансацілази. У той же час, ЦЕР може впливати на синтез КЛ, регулюючи фермент його синтезу – фосфатидилгліцерофосфатсинтазу (Xu F. Y., 1999).

Таким чином, встановлено, що використані в роботі екзогенні натуральні і синтетичні ЦЕР істотно знижують вміст КЛ в серці і клітинах печінки 3-місячних щурів.

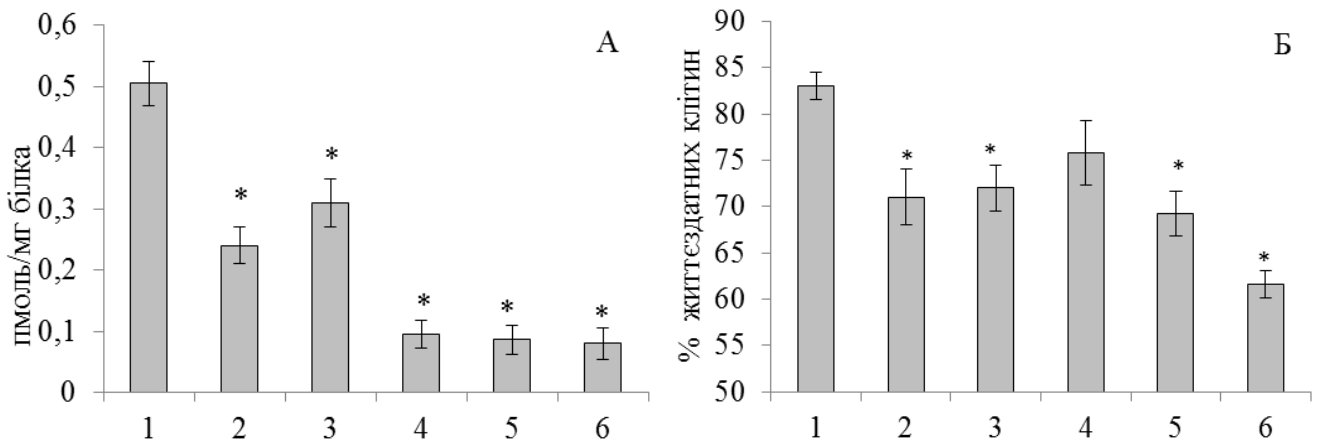


Рис. 4 Вплив екзогенних ЦЕР на включення [14С]лінолевої кислоти до складу КЛ (А) та життєздатність (Б) гепатоцитів 3-місячних щурів

Примітки: 1) 1 - Контроль; 2 - С16-церамід (60 μM); 3 - С18-церамід (60 μM); 4 – С2-церамід (15 μM); 5 – С2-церамід (30 μM); 6 – С2-церамід (60 μM); 2) * – $p < 0,05$ у порівнянні з групою «Контроль»

Вплив екзогенного С16-цераміду на вміст КЛ в гіпокампі і корі мозку та поведінку 3-місячних щурів. На наступному етапі дослідження вивчали вміст КЛ та поведінку щурів під впливом інтраназального введення 3-місячним щурам С16-цераміду. В результаті експерименту щури, які отримували С16-церамід вже після 4-го внутрішньоназального введення починали віддавати перевагу воді, тоді як контрольні тварини продовжували віддавати перевагу 2 % розчину сахарози. Відомо, що щури зазвичай віддають перевагу солодкому розчину ніж воді, проте передбачається, що при розвитку депресивно-подібних станів у тварин з'являється ангедонія – стан при якому тварина відмовляється від таких позитивних стимулів, як вживання солодкого в умовах вільного вибору між водою і розчином сахарози (Pothion S., 2004; Strekalova T., 2004). Порівняння схильності до вживання солодкого розчину між інтактними щурами 3-, 24- та 30-32-місячного віку виявило, що старі щури в значно меншому ступені віддають перевагу розчину сахарози, ніж 3-місячні тварини. З огляду на те, що деякі дослідники пов'язують накопичення ЦЕР в мозку з появою депресивно-подібних станів (Gulbins E., 2013), можна припустити, що саме збільшення ЦЕР в мозку 3-місячних щурів може відповідати за розвиток ангедонії.

В даний час вважається, що тварина, яка схильна до депресивно-подібного стану, менше часу витрачає на спроби вивільнитися з незручного становища (Shimano M. M., 2007; Krishnan V., 2011). В нашій роботі встановлено значне збільшення часу нерухомості тварин, які отримували С16-церамід (рис. 5 А), що підтверджує результати отримані при аналізі переваги до сахарози і характеризують розвиток депресивно-подібної поведінки при дії С16-цераміду. Щури, які отримували С16-церамід, порівняно з контрольними щурами, в тесті «темний/світлий відсік» продемонстрували зменшення кількості переходів до світлого відсіку, зниження локомоторної активності, та збільшення часу проведеного у темному відсіку (рис. 5 Б), що характеризує зростання рівня тривожності та зменшення дослідницької активності тварин. Крім того, оцінити тривожність і дослідницький інстинкт можна в тесті «годування в незнайомій

обстановці», коли тварину, яка голодувала протягом 24 годин, поміщають в незнайому клітку, в якій знаходиться звична для неї їжа. При вивченні ефектів введення С16-цераміду встановлено, що контрольні тварини набагато менше часу витрачали на дослідження нової території і швидше адаптувалися до нової обстановки на відміну від тварин дослідної групи (рис. 5 В). Крім того, поведінкові реакції «догляду за собою» досліджували в тесті «Сплеш», при якому мордочку шура обприскували концентрованим солодким розчином, що призводило до активізації очисних реакцій у щурів. Встановлено, що введення С16-цераміду призводило до збільшення часу протягом, якого у тварин дослідної групи з'являлася необхідність грумінгових реакцій, а загальний час, витрачений на очисні реакції зменшувався (рис. 5 Г).

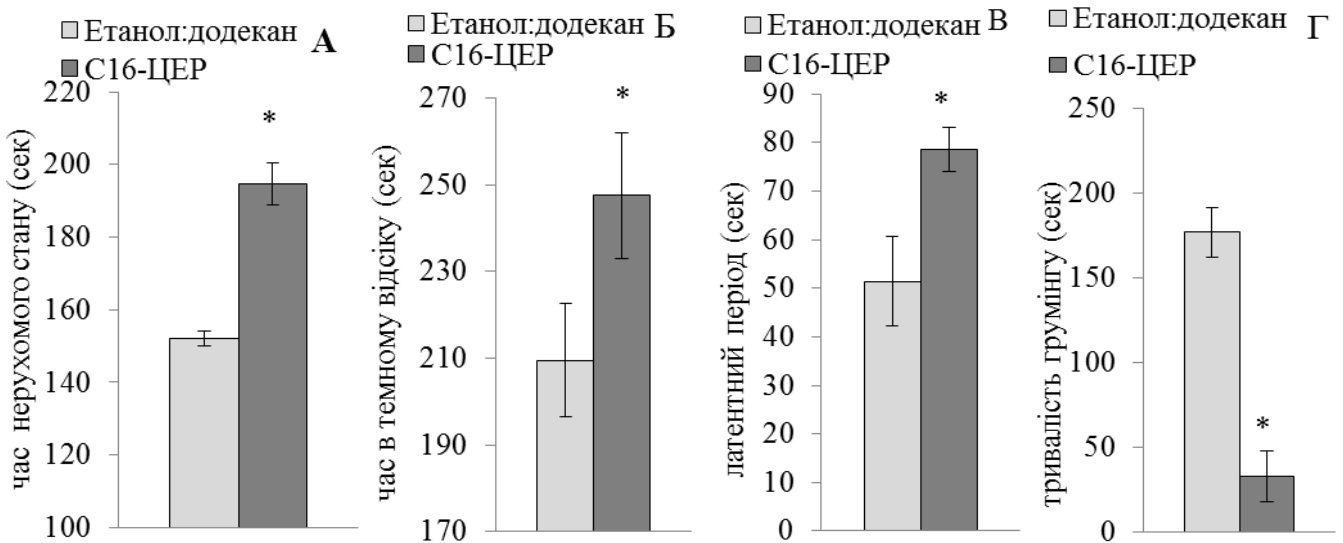


Рис. 5 Особливості поведінки щурів після назального введення С16-цераміду в тесті «імобілізації за хвіст щурів» (А), «темний/світлий відсік» (Б), при годуванні в незнайомій обстановці (В), та «Сплеш-тесті» (Г). Примітка. * – $p < 0,05$ у порівнянні з групою «Етанол:додекан»

Крім того, в ході цієї роботи було встановлено, що введення 3-місячним щурам С16-цераміду призводило до зростання вмісту ендогенних ЦЕР (на 27 %), і зменшенню рівня КЛ (на 22 %) в гіпокампі. Таким чином, в даній роботі встановлено взаємозв'язок між змінами вмісту КЛ і ЦЕР, а також розвитком асоційованої з віком тварин депресивно-подібної поведінки. З огляду на те, що ЦЕР може безпосередньо впливати на МТХ та мітохондріальні ліпіди, отримані дані дозволяють припустити, що збільшення рівня ЦЕР в мозку веде до змін метаболізму КЛ, і зниження рівня цього ліпиду, що в свою чергу може викликати появу депресивно-подібних розладів у щурів.

Вплив інгібіторів обміну СФЛ на вміст КЛ в тканинах і клітинах 24-місячних щурів. Вікове накопичення ЦЕР в клітинах деякі дослідники зв'язують з надмірною активацією сфінгомеліназ (Babenko N. A., 2006). Низкою попередніх досліджень було продемонстрована можливість модуляції вікових змін обміну СФЛ в різних тканинах старіючого організму за допомогою іміпраміну (Garkavenko V. V., 2012) або N-ацетилцистеїну (Babenko N. A., 2014). Встановлено, що рівень КЛ,

знижений в серці і печінці 24-місячних щурів, збільшувався в цих тканинах при дії іміпраміну, золедронової кислоти або N-ацетилцистеїну. Так, знижений вміст КЛ в печінці 24-місячних щурів ($3,19 \pm 0,18$ нмоль/мг білка), збільшувався до $5,86 \pm 0,25$ нмоль/мг білка (при дії іміпраміну) та до $5,40 \pm 0,25$ нмоль/мг білка (при дії золедронової кислоти). Таким чином, іміпрамін і золедронат в печінці викликали значне збільшення вмісту КЛ, як в порівнянні зі старими, так і з 3-місячними тваринами ($4,45 \pm 0,24$ нмоль/мг білка). У той же час в серці, обидва препарати збільшували рівень КЛ до $6,61 \pm 0,34$ нмоль/мг білка (у щурів які отримували іміпрамін) і до $6,98 \pm 0,27$ нмоль/мг білка (при дії золедронової кислоти) в порівнянні з контрольними щурами 24-місячного віку, вміст КЛ в яких становив $3,94 \pm 0,13$ нмоль/мг білка. Встановлено, що в серці обрані дози інгібіторів кислої сфінгомелінази виявилися недостатніми для відновлення вмісту КЛ до рівня 3-місячних щурів ($9,1 \pm 0,48$ нмоль/мг білка), хоча і підвищували вміст КЛ в порівнянні з 24-місячними щурами ($3,94 \pm 0,13$ нмоль/мг білка). При цьому інгібітор нейтральної сфінгомелінази – N-ацетилцистеїн відновлював рівень КЛ в серці ($8,62 \pm 0,41$ нмоль/мг білка) і печінці ($4,5 \pm 0,27$ нмоль/мг білка) до рівня молодих тварин (відповідно $9,1 \pm 0,48$ нмоль/мг білка в серці, та $4,45 \pm 0,24$ нмоль/мг білка в печінці 3-місячних щурів). У корі мозку лише пригнічення активності нейтральної сфінгомелінази дією N-ацетилцистеїну значно підвищувало вміст КЛ (на $26,1 \pm 1,29$ % порівняно з таким у мозку контрольних 24-місячних щурів), що може пояснюватися тканинної специфічністю дії різних сфінгомеліназ.

В подальших дослідженнях для вивчення взаємозв'язку поведінки тварин і вмісту КЛ 24-місячним щурам інтраназально вводили N-ацетилцистеїн (рис. 6).

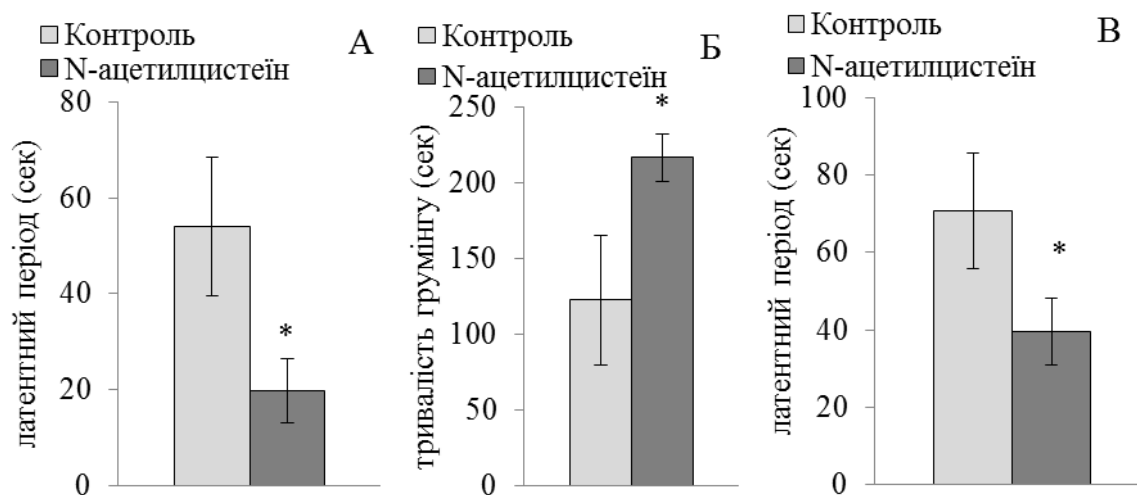


Рис. 6 Вплив N-ацетилцистеїну на особливості поведінки щурів 24-місячного віку в «Сплеш-тесті» (А та Б) та при годуванні в незнайомій обстановці (В). Примітка. * – $p < 0,05$ у порівнянні з групою «Контроль»

Встановлено, що введення N-ацетилцистеїну старим 24-місячним щурам протягом 14 днів шляхом інтраназального вприскування призводило до підвищення рівню КЛ (на 86 %) та зменшенню відношення ЦЕР/сфінгомелінін з $0,80 \pm 0,08$ (в гіпокампі контрольних щурів) до $0,49 \pm 0,03$ (у гіпокампі щурів, що отримували N-ацетилцистеїн). Ці зміни вмісту ліпідів у гіпокампі супроводжувалися коригуванням

поведінки піддослідних щурів. Так, вже після 9 введення N-ацетилцистеїну щури дослідної групи починали віддавати перевагу солодкому розчину сахарози, значно зменшувався латентний період перед початком грумінгових реакцій які склались з очисних реакцій та вмиваній (рис. 6 А), збільшувався загальний час догляду за собою (рис. 6 Б). В тесті годування щурів в незнайомій обстановці дослідні тварини скоріше адаптувалися до нової клітці, та раніше починали приймати їжу (рис. 6 В), що може свідчити про зменшення рівня їхньої тривожності. Таким чином отримані данні є строгим доказом того, що депресивно-подібна поведінка пов'язана із рівнями ЦЕР та КЛ, а регулювання вмісту цих сигнальних ліпідів дозволяє коригувати вік-асоційовані депресивно-подібні стани та прояви тривожності.

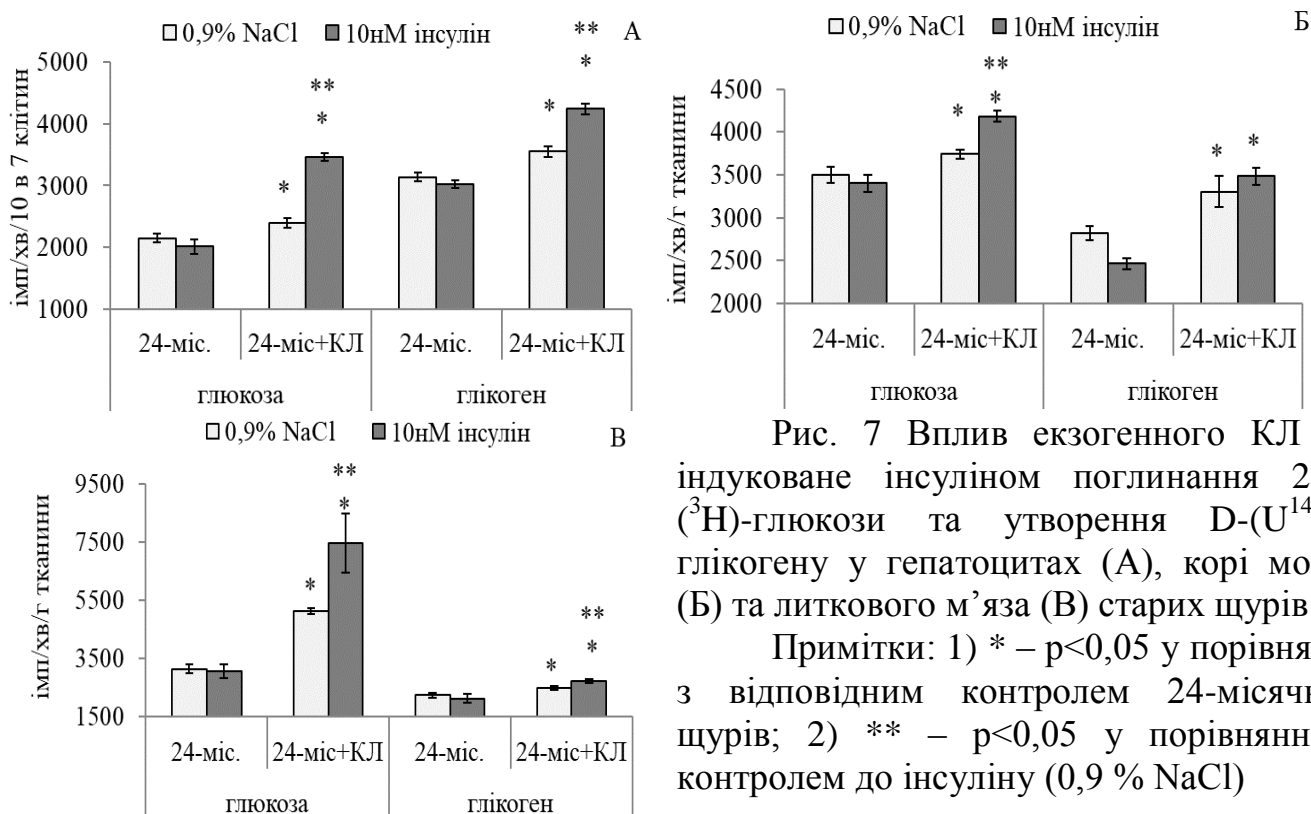
Вплив екзогенного КЛ на чутливість клітин 24-місячних щурів до інсуліну. Враховуючи те, що при старінні знижується чутливість клітин та тканин до дії інсуліну, а також встановлене вікове зниження вмісту КЛ в клітинах, наступним етапом нашої роботи явилось вивчення впливу екзогенного КЛ на функціональний стан клітин та тканин 24-місячних щурів.

В нашої роботі екзогенний КЛ вводили до середовища інкубації гепатоцитів, м'язової тканини або кори мозку старих щурів, та вивчали здібності цих клітин та тканин поглинати глюкозу та синтезувати глікоген при дії інсуліну. Встановлено, що додавання КЛ до середовища культивування гепатоцитів, кори мозку або литкового м'яза призводило до збільшення поглинання клітинами міченої глюкози та підсилювала синтез глікогену (рис. 7). Раніше було виявлено різке зниження здатності інсуліну індукувати поглинання глюкози і синтез глікогену в гепатоцитах 24-місячних щурів у порівнянні з молодими 3-місячними щурами (Babenko N. A., 2012). Внесення до середовища інкубації гепатоцитів, кори мозку та литкового м'яза екзогенного КЛ не тільки збільшувало пасивне поглинання клітинами глюкози, але й призводило до значного зростання інсулін-стимульованого поглинання міченої глюкози дослідженими клітинами та тканинами (рис. 7). Крім того, стимуляція інсуліном гепатоцитів та литкового м'язу, але не тканин мозку попередньо інкубованих з екзогенним КЛ призводила до підвищення використання міченої глюкози в синтезі глікогену (рис. 7).

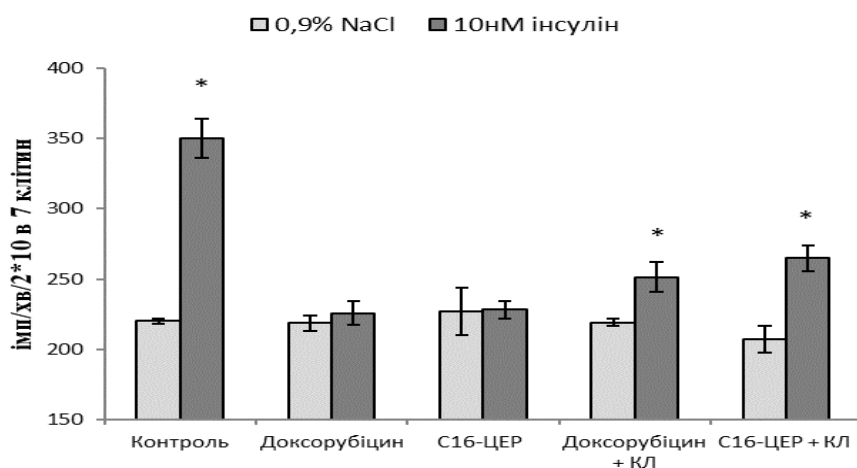
Виявлено, що на клітинному рівні в розвитку інсулін-резистентності ключову роль відіграє порушення функціонування МТХ. В той же час, КЛ грає важливу роль у функціонуванні дихального ланцюга в клітинах, а окисне пошкодження цього фосфоліпиду або зменшення його вмісту асоціюється з порушеннями комплексів респіраторного ланцюга та розвитком мітохондріальної дисфункції (Chicco A. J., 2007; Claypool S. M., 2009).

Роботами Робінсона та співавторів (Robinson N. C., 1990), було показано, що саме екзогенно доданий КЛ, але не інші фосфоліпиди, виявився ефективним при відновленні активності комплексів респіраторного ланцюга. Крім того, у дослідях *in vitro* встановлено, що екзогенний КЛ або фосфатидилгліцерол здатен проникати у внутрішню мембрану МТХ головного мозку щурів та попереджати вивільнення цитохрому с, запобігаючи активації сигналів в апоптозному каскаді (Piccotti L., 2002). В той же час відомо, що ЦЕР може впливати на функціонування МТХ, пригнічуючи дихальну активність респіраторного ланцюга, і регулюючи

проникність зовнішньої мембрани МТХ для цитохрому с (Novgorodov S. A., 2011; Kujjo L. L., 2012; Stiban J., 2008).



Ці дані дозволяють припустити, що збільшення концентрації внутрішньоклітинних ЦЕР викликає порушення сигналіngu інсуліну, шляхом впливу на МТХ, тоді як збільшення вмісту КЛ в МТХ відновлює функціонування цих органел і нівелює ефекти накопичення ЦЕР в клітинах. Для підтвердження цього припущення у наступній серії експериментів ми досліджували вплив екзогенного КЛ на інсулін-стимульоване поглинання глюкози в умовах моделювання підвищеного рівня ЦЕР в клітинах молодих тварин. Встановлено, що інкубація клітин в присутності доксорубіцину або С16-цераміду призводить до порушення поглинання глюкози клітинами молодих тварин, тоді як введення в середовище інкубації клітин КЛ значно підсилює інсулін-стимульоване поглинання глюкози клітинами (рис. 8).



Таким чином, встановлено збільшення поглинання глюкози і синтезу глікогену клітинами і тканинами старих щурів при введенні в середовище їх інкубації екзогенного КЛ. Через це, значне збільшення інсулін-стимульованого поглинання глюкози і синтезу глікогену в клітинах і тканинах при дії КЛ може сприяти підвищенню чутливості клітин до інсуліну та покращенню фізіологічного стану клітин старих тварин. Отже, отримані данні дозволяють припустити, що сигнальні функції ЦЕР можуть бути опосередковані через його ефекти на метаболізм КЛ, зміни рівня якого в свою чергу визначають функціональний стан клітин і тканин в процесі онтогенезу. Підвищення поглинання глюкози гепатоцитами 3-місячних щурів при дії екзогенного КЛ після індукції накопичення ЦЕР доксорубіцином або С16-церамідом підтверджує це припущення.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі доведено, що вікове або експериментально індуковане накопичення ЦЕР супроводжується зниженням рівня КЛ в серці, печінці та мозку щурів. Крім того, зменшення вмісту КЛ в гіпокампі 3-місячних щурів, викликане введенням С16-цераміду, супроводжувалось появою депресивно-подібних розладів поведінки щурів, подібних до спостережуваних у щурів старечого віку: зростанням тривожності, пригніченням локомоторної та дослідницької активності, ослаблення інстинктів догляду за собою. В той же час збільшення вмісту КЛ в мозку 24-місячних щурів шляхом введення N-ацетилцистеїну, який інгібує продукцію ЦЕР, призводило до корекції депресивно-подібної поведінки щурів. Додавання екзогенного КЛ до середовища культивування гепатоцитів, м'язової тканини і кори мозку старих щурів призводило до збільшення інсулін-стимульованого поглинання клітинами міченої глюкози та синтезу глікогену, що може свідчити про покращення фізіологічного стану клітин та тканин старих тварин.

1. Встановлено зниження вмісту КЛ у серці, печінці, корі мозку, гіпокампі та в мітохондріях серця, печінки та кори мозку 24-місячних щурів лінії Вістар у порівнянні з вмістом цього ліпиду в тканинах 3-місячних тварин.

2. Встановлено зниження вмісту КЛ в серці та печінці 3-місячних щурів, при дії етанолу, збагачення насиченими жирними кислотами раціону, або внутрішньо м'язовому введенні доксорубіцину. В той же час утримання щурів на калорійно-обмеженому раціоні, який попереджав накопичення ЦЕР з віком, запобігало зниженню рівня КЛ у серці, печінці та корі мозку 24-місячних щурів, зберігаючи вміст цього ліпиду на рівні 3-місячних тварин.

3. Встановлено зниження вмісту КЛ в м'язовій тканині серця 3-місячних щурів після перфузії цього органу С16-церамідом та в гепатоцитах молодих щурів при культивуванні клітин у присутності екзогенних С2-, С16-, С18-церамідів, або препаратів які індукують накопичення ЦЕР – пальмітинової кислоти та доксорубіцину. В той же час інгібітор серинпальмітоїлтрансферази – міріюцин, попереджуючий накопичення ЦЕР, нівелював ефекти доксорубіцину на гепатоцити, знижуючи рівень ЦЕР та нормалізував вміст КЛ к клітинах молодих щурів.

4. Зростання вмісту ЦЕР в гіпокампі 3-місячних щурів шляхом інтраназального введення С16-цераміду приводило до зниження вмісту КЛ в мозку

та появи депресивноподібних особливостей поведінки: зниження локомоторної та дослідницької активності, поява ангедонії, зменшення часу витраченого на очисні реакції та зростання тривожності. Виявлені зміни у поведінці щурів та вмісті КЛ в мозку молодих тварин були подібні до таких у інтактних щурів 24-місячного віку.

5. Зниження вмісту ЦЕР в мозку 24-місячних щурів за допомогою інтраназального введення інгібітору нейтральної сфінгомелінази – N-ацетилцистеїну приводила до збільшення вмісту КЛ та корекції депресивно-подібної поведінки піддослідних щурів: зменшення тривожності, підвищення локомоторної та дослідницької активності, зменшення латентного періоду перед початком грумінгових реакцій та збільшення загального часу догляду за собою.

6. Внутрішньом'язове введення інгібіторів кислої сфінгомелінази – іміпраміну або золедронової кислоти запобігало зниженню вмісту КЛ у серці та печінці 24-місячних щурів. Внутрішньошлункове введення інгібітору нейтральної сфінгомелінази – N-ацетилцистеїну, дозволяло нормалізувати знижений рівень КЛ в печінці, серці та мозку 24-місячних тварин до такого в тканинах 3-місячних щурів.

7. Внесення екзогенного КЛ до середовища інкубації клітин печінки, кори мозку або литкового м'язу 24-місячних щурів, або гепатоцитів 3-місячних щурів, попередньо інкубованих з доксорубіціном або С16-церамідом, підвищує чутливість цих клітин до дії інсуліну: збільшує базальне та гормон-стимульоване поглинання ними глюкози і синтез глікогену.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у виданнях що входять до переліку фахових видань України

1. Гарькавенко В. В., **Стороженко Г. В.**, Краснікова О. М., Бабенко Н. О. Корекція вікових порушень вмісту сфінголіпідів у тканинах щурів за допомогою інгібування кислої сфінгомелінази // Фізіол. журн. 2012. Т. 58(1). С. 56-60. *(Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні фізіологічних та біохімічних досліджень, здійснював статистичний аналіз одержаних даних).*

2. **Стороженко Г. В.**, Бабенко Н. А. Влияние пальмитиновой кислоты на содержание кардиолипина и фосфатидной кислоты в изолированных гепатоцитах крыс // Вісник Харків. нац. ун-ту імені В. Н. Каразіна. Сер.: біологія. 2010. Т. 11. № 905. С. 32–36.

Статті у виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз

3. Babenko N. A., **Storozhenko G. V.** Role of ceramide in reduction of the cardiolipin content in the heart during aging // Adv Gerontol. 2017. Vol. 30(1). P. 43-48. (SCOPUS, PubMed).

4. Babenko N. A., **Storozhenko G. V.** Long-term food restriction prevents the age-related changes of the content of biologically active sphingo- and glycerolipids contents in the rat tissues. Fiziol Zh. 2016. Vol. 62(2). P. 103–109. (SCOPUS).

5. Babenko N. A., Garkavenko V. V., **Storozhenko G.V.**, Timofiychuk O. A. Role of acid sphingomyelinase in the age-dependent dysregulation of sphingolipids turnover in the tissues of rats // *Gen. Physiol. Biophys.* 2016. Vol. 35(2). P. 195–205. (SCOPUS, PubMed). *(Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні фізіологічних та біохімічних досліджень, здійснював статистичний аналіз одержаних даних).*

Тези науково-практичних конференцій різного рівня

6. **Стороженко Г. В.** Ефекти екзогенного кардіоліпіну на функціональний стан клітин та тканин старих щурів // Теорія і практика актуальних наукових досліджень : наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 27-28 жовтня 2017 р. : тези доп. Львів, 2017. С. 61–63.

7. **Стороженко Г. В.** Влияние витамина E и n-ацетилцистеина на содержание кардиолипина в различных тканях старых крыс // *Фізіол. журн. (Додаток)*. 2014. Т. 60, № 3. С. 187.

8. **Стороженко Г. В.,** Гарькавенко В. В. Модуляция вызванных доксорубицином изменений липидного обмена клеток печени ингибиторами сфингомиелиназной активности // *The Ukrainian biochemical journal* 2014. Vol. 86, N 5 (Supplement 1). С. 208. *(Здобувач брав участь у проведенні експерименту та обговоренні результатів досліджень, оформлював одержані дані у вигляді тез доповіді).*

9. **Стороженко Г. В.,** Харченко В. С., Бабенко Н. А. Церамид и фосфолипаза D-зависимый сигналинг инсулина // *Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології (Дванадцяті Данилевські читання) : наук.-практ. конф., 14-15 бер. 2013 р. : тези доп. Харків, 2013. С. 130–131. (Здобувач брав участь у плануванні експерименту проводив фізіологічні дослідження та аналізував отримані результати).*

10. **Стороженко Г. В.** Влияние модуляторов обмена сфинголипидов на содержание кардиолипина в различных тканях крыс // *Липидология – наука XXI века : I науч.-практ. интернет конф. с международ. участием, 26 ноября 2013 г. : тезисы докл. Казань, 2013. С. 188–189.*

11. **Стороженко Г. В.** Избыток насыщенных жиров в диете молодых крыс вызывает изменения липидного спектра, характерные для старения // *Биологические механизмы старения : IX междунар. симп., 16-19 мая 2012 р. : тезисы докл. Харьков, 2012. С. 55.*

12. **Стороженко Г. В.** Вплив екзогенного С2-цераміда на вміст кардіоліпіна та загальних фосфоліпідів у гепатоцитах тримісячних щурів // *Фізіол. журн. (Додаток)*. 2010. Т. 56, № 2. С. 199.

13. **Стороженко Г. В.** Изучение влияния пальмитиновой кислоты на содержание кардиолипина в изолированных гепатоцитах старых крыс изменения // *Биологические механизмы старения : IX междунар. симп., 26-29 мая 2010 г. : тезисы докл. Харьков, 2010. С. 25-26.*

14. **Стороженко Г. В.** Изменение содержания кардиолипина и общих фосфолипидов в печени и сердце крыс при действии этанола и его коррекция

рыбьим жиром // Фундаментальні та прикладні дослідження в біології : наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 23-26 лют. 2009 р. : тези доп. Донецьк, 2009. С. 67–68.

15. **Storozhenko G.** Effect of the c2-ceramide on the cardiolipin content in rat hepatocytes // Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution : IV International young scientists conference, 16-19 sept. 2009. : abstr. Odessa, Ukraine, 2009. P. 181.

16. **Storozhenko G.** Cardiolipin content in Wistar rats hepatocytes under exposure to C-2 ceramide // Біологія від молекули до біосфери : наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 17-21 лист. 2009 р. : тези доп. Харків, 2009. С. 64.

17. **Стороженко Г. В.** Влияние флавоноида кверцетина на содержание фосфолипидов и кардиолипина в функционально различных тканях крыс // Валеология: сучасний стан, напрямки та перспективи розвитку : наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 12-14 квіт. 2008 р. : тези доп. Харків, 2008. С. 215–219.

18. **Стороженко Г. В.,** Куликова В. С. Влияние высококалорийной диеты и кверцетина на содержание липидов в печени молодых крыс и ответ ткани на действие инсулина // Фундаментальна та клінічна ендокринологія: проблеми, здобутки, перспективи (Сьомі Данилевські читання) : наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 21-22 лют. 2008 р. : тези доп. Харків, 2008. С. 129-131. (*Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні фізіологічних досліджень та здійснював статистичний аналіз отриманих даних*).

19. **Стороженко Г. В.** Возрастные особенности содержания кардиолипина и фосфатидной кислоты в различных органах крыс линии Вистар // Биологические механизмы старения : VIII междунар. симп., 21-24 мая 2008 г. : тезисы докл. Харьков, 2008. С. 48.

20. **Стороженко Г. В.** Возрастная динамика содержания кардиолипина и фосфатидной кислоты в печени и сердце крыс самцов линии Вистар // Біологія від молекули до біосфери : наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 18-21 лист. 2008 р. : тези доп. Харків, 2008. С. 156–157.

21. **Стороженко Г. В.** Модулирующее влияние кверцетина на содержание липидов в различных органах крыс при действии этанола // Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології : наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 30-31 жовт. 2008 р. : тези доп. Дніпропетровськ. 2008. С. 112.

Статті, що додатково відображають зміст дисертації

22. Бабенко Н. А. **Стороженко Г. В.** Коррекция возрастного нарушения содержания кардиолипина в тканях крыс путем подавления активности нейтральной сфингомиелиназы // Проблемы старения и долголетия. 2015. Т. 24(3-4). С. 257–265.

23. **Стороженко Г. В.** Корекція індукованих етанолом порушень ліпідного профілю у тканинах щурів // Одеський медичний журнал. 2014. Т. 3(143). С. 30–34.

24. Бабенко Н. А., **Стороженко Г. В.,** Гарькавенко В. В. Роль N-ацетил-d-эритро-сфингозина в нарушении обмена липидов и жизнеспособности клеток печени // Экспериментальна і клінічна медицина. 2011. Т. 1(50). С. 27–32. (*Здобувач брав*

участь у постановці експерименту, проведенні фізіологічних та біохімічних досліджень, здійснював статистичний аналіз одержаних даних).

АНОТАЦІЯ

Стороженко Г. В. Роль сфінголіпідів у порушенні обміну кардіоліпіну та функціонального стану клітин і тканин у процесі старіння. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини та тварин. – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна МОН України, Харків, 2019.

У дисертаційній роботі встановлений взаємозв'язок між вмістом кардіоліпіну (КЛ), цераміду (ЦЕР) і фізіологічним станом тканин щурів лінії Вістар. Доведено, що вікове або експериментально індуковане накопичення ЦЕР супроводжується зниженням рівня КЛ в серці, печінці та мозку щурів. Так, встановлено зниження вмісту КЛ в серці та печінці 3-місячних щурів, при дії етанолу, збагачення насиченими жирними кислотами раціону, або внутрішньом'язовому введенні доксорубіцину. В той же час утримання щурів на калорійно-обмеженому раціоні, який попереджав накопичення ЦЕР з віком, запобігало зниженню рівня КЛ у серці, печінці та корі мозку 24-місячних щурів, зберігаючи вміст цього ліпиду на рівні 3-місячних тварин. Крім того, встановлено зниження вмісту КЛ при культивуванні клітин 3-місячних щурів у присутності екзогенних С2-, С16-, С18-церамідів, або препаратів які індукують накопичення ЦЕР – пальмітинової кислоти та доксорубіцину. Зменшення вмісту КЛ в гіпокампі 3-місячних щурів, викликане введенням С16-цераміду, супроводжувалось появою депресивно-подібних розладів поведінки щурів, подібних до спостережуваних у щурів старечого віку: зростанням тривожності, пригніченням локомоторної та дослідницької активності, ослаблення інстинктів догляду за собою. В той же час збільшення вмісту КЛ в мозку 24-місячних щурів шляхом введення N-ацетилцистеїну, який інгібує продукцію ЦЕР, призводило до корекції депресивно-подібної поведінки щурів. Додавання екзогенного КЛ до середовища культивування гепатоцитів, м'язової тканини і кори мозку старих щурів призводило до збільшення інсулін-стимульованого поглинання клітинами міченої глюкози та синтезу глікогену, що може свідчити про відновлення фізіологічного стану клітин та тканин старих тварин.

Ключові слова: кардіоліпін, фосфатидна кислота, церамід, сфінголіпіди, старіння, гепатоцити, неокортекс, серце, печінка, поведінка щурів.

АННОТАЦИЯ

Стороженко Г. В. Роль сфинголипидов в нарушении обмена кардиолипина и функционального состояния клеток и тканей в процессе старения. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13 – физиология человека и животных. – Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина МОН Украины, Харьков, 2019.

В диссертационной работе установлена взаимосвязь между содержанием кардиолипина (КЛ), церамида (ЦЕР) и физиологическим состоянием тканей крыс линии Вистар. Показано, что возрастное или экспериментально индуцированное накопление ЦЕР сопровождается снижением уровня КЛ в сердце, печени и мозгу крыс. Так, установлено снижение содержания КЛ в сердце и печени 3-месячных крыс при действии этанола, обогащения насыщенными жирными кислотами рациона, или введении доксорубина. В то же время, содержание крыс на калорийно-ограниченном рационе препятствовало возрастному накоплению ЦЕР и предотвращало снижение уровня КЛ в сердце, печени и коре мозга 24-месячных крыс, сохраняя содержание этого липида на уровне 3-месячных животных. Кроме того, установлено снижение содержания КЛ при культивировании клеток 3-месячных крыс в присутствии экзогенных С2, С16-, С18-церамидов, или препаратов, которые индуцируют накопление ЦЕР - пальмитиновой кислоты и доксорубина. Уменьшение содержания КЛ в гиппокампе 3-месячных крыс, вызванное введением С16-церамида, сопровождалось появлением депрессивно-подобных расстройств поведения крыс, подобных наблюдаемых у крыс старческого возраста: возрастанию тревожности, угнетению локомоторной и исследовательской активности, ослабление инстинктов ухода за собой. В то же время увеличение содержания КЛ в мозгу 24-месячных крыс путем введения N-ацетилцистеина, который ингибирует продукцию ЦЕР, приводило к коррекции депрессивно-подобного поведения крыс. Добавление экзогенного КЛ к среде культивирования гепатоцитов, мышечной ткани и коры мозга старых крыс приводило к увеличению инсулин-стимулированного поглощения клетками меченой глюкозы и синтеза гликогена, что может свидетельствовать о восстановлении физиологического состояния клеток и тканей старых животных.

Ключевые слова: кардиолипин, фосфатидная кислота, церамид, сфинголипиды, старение, гепатоциты, неокортекс, сердце, печень, поведение крыс.

ABSTRACT

Storozhenko G. V. Role of sphingolipids in disturbance the cardiolipin metabolism and the functional state of cells and tissues in aging. –Qualification scientific paper, manuscript.

Thesis for a Candidate Degree in Biology: Specialty 03.00.13 – Physiology of human and animals. – V. N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2019.

In the present work the interrelations between cardiolipin (CL) and ceramide (CER) levels and functional state of the Wistar line rats' tissues were investigated. It was shown that age-related or experimentally induced accumulation of CER is accompanied by a decrease in the level of CL in the heart, liver and brain of rats.

Various models for endogenous CER level elevation in cells and tissues of young animals have been used. Doxorubicin administration in young rats resulted in a CL content decrease in heart and addition of this drug to the hepatocytes incubation media resulted in a CL content decrease in liver cells of 3-month-old rats compared to control rats or cells. To determine if the observed CL reduction was referred to the CER accumulation, the modulators of CER cell metabolism – imipramine, GW4869 or myriocin – were used. It was found that inhibition of the CER de novo synthesis pathways by myriocin resulted in CL and phosphatidic acid content normalization in hepatocytes of 3-month-old rats.

In our work, the enrichment of the diet lipid component with saturated fatty acids from beef fat led to a decrease in CL content and to phosphatidic acid accumulation in tissues comparing with the rats received the standard diet. At the same time, diet caloric content limiting which is known to prevent CER content increase in aging cells, in turn, prevented CL levels reduction in heart, liver and brain of 24-month-old rats. In addition, intragastric ethanol administration to 3-month-old rats resulted in CL content decrease and fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids or quercetin administration known to prevent CER accumulation prevented as well CL content reduction in heart and liver of ethanol-fed rats.

To prove the CER role in CL exchange and content modulation, exogenous natural and synthetic CER were used in model experiments in isolated cells. It was determined that hepatocytes incubation with exogenous CER caused CL level decrease in liver cells of 3-month-old rats. At the same time, C2-ceramide addition to hepatocyte incubation medium in 3-month-old rats` cells led both to CL level decrease and a drop in isotope-labeled linoleic acid inclusion to newly synthesized CL as well as increase in content of phosphatidic acid, which is phospholipid synthesis precursor. The obtained data indicate that CER content increase in the cell causes CL level decrease, via CL remodeling inhibition, which in turn can lead to cell death and liver pathologies development. At the same time, perfusion of hearts of young rats with C16-ceramide led to CL content decrease in heart muscle tissue, thus the relationship between the CER and CL content was revealed in the rat heart.

In order to reveal the role of endogenous brain CER in CL content age-related changes and brain functional state, the exogenous C16-ceramide effect on CL content in cortex and hippocampus of young rats was studied as well as brain functional state. For this purpose, young 3-month-old rats were given C16-ceramide by intranasal injection that led to CER level increase and CL content reduction in hippocampus, and emergence of some distinctive features in behavior of experimental rats such as increased anxiety, locomotor and research activity inhibition, and weakening of self-care instincts, which may indicate a depression-like state. At the same time, N-acetylcysteine (drug that reduces CER level by inhibiting neutral sphingomyelinase) administration in old rats led to CL level recovery and depressive-like behavior signs disappearance.

To determined how the age-related changes in CL content influences on the physiological state of cells, the effects of exogenous CL on affect target cells ability to response adequately insulin signal were studied. It was determined that exogenous CL introduction into the cell incubation medium of 24-month-old rat liver, cortex or calf muscle cells increased basal glucose absorption and glycogen synthesis as well as sensitivity of these cells to insulin. In model experiments on isolated liver cells, it was

found that exogenous CL addition to hepatocytes incubation medium in 3-month-old rats after doxorubicin or C16-ceramide CER accumulation induction leads to an increase in basal and insulin-stimulated glucose uptake and glycogen synthesis. Thus, the obtained data suggest that age-related CL content changes may play an important role in reducing insulin sensitivity in classical target tissues and in brain.

Key words: cardiolipin, phosphatidic acid, ceramide, sphingolipids, aging, hepatocytes, neocortex, heart, liver, behavior of rats.