

НАРУШЕНИЯ БАЛАНСА СФИНГОЛИПИДОВ В ТКАНЯХ И МОДИФИКАЦИИ ПОВЕДЕНИЯ КРЫС ПОД ДЕЙСТВИЕМ НЕЙРОГЕННОГО СТРЕССА: РОЛЬ ИЗМЕНЕНИЙ АКТИВНОСТИ СФИНГОМИЕЛИНАЗ

Поступила 27.02.15

Исследовали изменения содержания церамида и сфингомиелина (СФМ) в неокортексе и периферических тканях крыс после действия длительного нейrogenного стресса (семь ежедневных сеансов ноцицептивной стимуляции в клетке с электрифицированным полом) и после подобного стресса, индуцируемого на фоне курсового (14-дневного) введения трициклического антидепрессанта имипрамина (функционального ингибитора кислой сфингомиелиназы – кСФМазы). Влияние имипрамина в существенной степени препятствовало развитию депрессияподобного состояния (ДПС): ослаблялось угнетение поисково-двигательной активности, уменьшались проявления «эмоциональных» феноменов (актов дефекации и уринации), становился меньшим латентный период выхода из центра поля. Введение стрессированному животному имипрамина обуславливало снижение отношения церамид/СФМ и уровней церамида в неокортексе, печени и сыворотке крови; содержание СФМ в сыворотке крови несколько повышалось по сравнению с соответствующими показателями у крыс, подвергнутых изолированному воздействию стресса. Сходные изменения содержания сфинголипидов происходили и при непосредственном воздействии имипрамина на изолированные срезы неокортекса стрессированных крыс. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли уровня активности кСФМазы в изменениях отношения церамид/СФМ в неокортексе крыс и соответствующих модификациях их поведения. Уровни сфинголипидов в сыворотке крови могут являться важным показателем эффективности действия антидепрессантов в условиях хронического стресса и развития ДПС.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нейrogenный стресс, открытое поле, церамид, сфингомиелин, имипрамин, неокортекс, периферические ткани.

ВВЕДЕНИЕ

Кислая сфингомиелиназа (кСФМаза) – фермент, участвующий в метаболизме сложных сфинголипидов; она обеспечивает поддержание адекватных уровней важных компонентов клеточных мембран, таких как церамид и сфингомиелин (СФМ). Активация гена, кодирующего кСФМазу, приводит к увеличению в тканях содержания двух форм этого фермента – лизосомальной [1] и секреторируемой в кровь [2]. Лизосомальная кСФМаза с оптимальным рН 5.0 является гликопротеидом, который катализирует деграцию СФМ и высвобождение церамида и фосфорилхолина. Несмотря на то что в

клетках существуют альтернативные пути продукции церамида, кСФМаза играет критическую роль в формировании «мембранного» ответа клеток на действие стресса [3, 4]. Транслокация кСФМазы на наружную поверхность клеточной мембраны, ее активация и последующее накопление церамида – характерные реакции клеток при действии на них CD95-лигандов, цитокинов, реактивных форм кислорода (РФК), ионизирующей радиации, противоопухолевых препаратов и других факторов, индуцирующих стресс и связанные с ним повреждение клеток, а также факторов, действующих в условиях инфекции [4–9]. Нарушения регуляции иммунного ответа и воспалительных реакций на фоне повышения уровней цитокинов и индукции оксидативного стресса были обнаружены у значительной части пациентов с признаками депрессивного состояния [10, 11]. Выяснилось, что активность кСФМазы в

¹ Научно-исследовательский институт биологии Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина (Украина).
Эл. почта: babenko@univer.kharkov.ua (Н. А. Бабенко).

периферических мононуклеарных клетках пациентов до начала лечения депрессии была повышена [12]. В условиях травматического стресса отмечались активация секреторной кСФМазы и накопление церамида в плазме крови пациентов с признаками депрессии [13]. В экспериментах на мышах была показана важная роль изменений системы кСФМазы и церамида в развитии состояний повышенной тревожности и депрессии [14]. У трансгенных мышей, которым была свойственна избыточная экспрессия кСФМазы, наблюдались снижение интенсивности нейрогенеза, подавление процесса созревания нейронов и падение их выживаемости [15], что характерно для так называемого депрессияподобного состояния (ДПС; данный термин используется в отношении промежуточных состояний, подобных, но не идентичных состоянию собственно депрессий в узком смысле слова). Развитие ДПС отражается на результатах ряда поведенческих тестов (открытое поле, темный/светлый отсек, предпочтение раствора сахарозы и др.) [15]. В то же время нокаутные по кСФМазе мыши 12-месячного возраста демонстрируют первые симптомы заболевания Ньюмана–Пика – снижение уровня церамида в гиппокампе, аномально высокую тревожность и признаки поведения, характерные для депрессивного состояния. Прямое доказательство значимости изменений уровня церамида в ЦНС для развития ДПС у мышей было получено в экспериментах, в ходе которых производили локальные инъекции церамида в дорсальный гиппокамп. Наблюдаемые в данном случае изменения поведения животных были подобны тем, которые отмечали при действии на мышей непредсказуемого хронического стресса. Введение этим животным различных антидепрессантов (которые в большинстве случаев являются ингибиторами кСФМазы [15]) в той или иной мере нормализовало процессы нейрогенеза и созревания нейронов в гиппокампе и препятствовало развитию ДПС у мышей. В ранее проведенных исследованиях было установлено, что под действием хронического нейрогенного стресса повышается соотношение церамид/СФМ и уменьшается количество субстрата СФМаз (т. е. СФМ) в гиппокампе и неокортексе крыс; это наблюдалось на фоне развития состояния эмоционального напряжения/перенапряжения с характерными признаками ДПС [16]. В то же время остается невыясненным вопрос, активация каких метаболических путей обмена сфинголипидов приводит к изменению их баланса в мозгу и параллельным модификациям поведения животных

в условиях действия хронического стресса на организм. Ввиду этого в настоящей работе для выяснения участия кСФМаз в изменении баланса между церамидом и СФМ в мозгу и поведения животных в открытом поле в условиях действия хронического нейрогенного стресса использовали функциональный ингибитор лизосомальной кСФМазы [15] трициклический антидепрессант имипрамин.

МЕТОДИКА

Эксперименты были проведены на молодых крысах-самцах линии Вистар (масса 180–220 г) со средним уровнем подвижности. Из них были сформированы четыре группы – интактных крыс, крыс, подвергнутых действию хронического нейрогенного стресса; стрессированных крыс, которым в ходе индукции стресса ежедневно в течение 14 дней начиная с первого дня стрессирования, внутривентриально вводили 5 мг/кг мелипрамина (имипрамина гидрохлорид; «Egis», Венгрия). Контрольным животным вводили растворитель имипрамина (0.9 %-ный раствор NaCl) по указанной выше схеме также в течение 14 дней. В эксперимент крыс брали через сутки после последнего введения препарата или его растворителя.

Для индукции нейрогенного стресса крыс на протяжении семи дней подвергали ежедневным сеансам ноцицептивной электростимуляции конечностей в камере с электрифицированным полом (длительность 1 ч). Использовали синусоидальный ток промышленной частоты (50 Гц); раздражение проводили по жестковременной схеме (повторяющиеся эпизоды электростимуляций длительностью по 10 с, разделенные интервалами по 10 с) [16]. Интенсивность ноцицептивной стимуляции подбирали так, чтобы согласно поведенческим оценкам она умеренно превышала болевой порог.

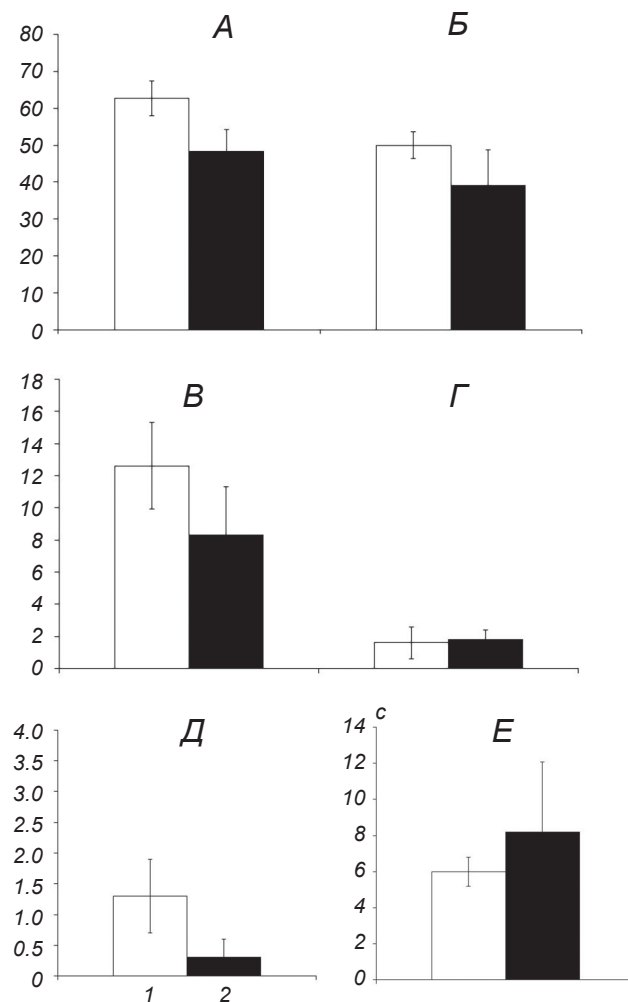
Поведение в открытом поле [17] тестировали с применением наиболее распространенной методики. Оценивали количество пересеченных квадратов и стоек (горизонтальную и вертикальную активность), количество актов-коррелятов «эмоциональности» (дефекаций и уринаций) и количество выходов в центр поля; измеряли значения латентного периода выхода из центра поля. У крыс со средним уровнем активности минимальная и максимальная сумма количеств пересечений квадратов и стоек за 5-минутный интервал наблюдения составляла 41 и 79 соответственно.

Для измерения содержания мембранных липидов в мозгу и периферических тканях животных брали на восьмой день после окончания стрессирования, т. е. через один день после последней инъекции имипрамина или 0.9 % NaCl (в группах 3 и 4). Печень и мозг наркотизированных крыс быстро извлекали, участки неокортекса выделяли на льду. В отдельных экспериментах блоки неокортекса животных, подвергнутых воздействию стресса, инкубировали в присутствии 50 мкМ имипрамина («Sigma», США) или DMSO в течение 2 ч при 37 °С. Экстракцию липидов из печени, сыворотки крови и мозга проводили по методу Блая и Дайера [18]. Разделение отдельных липидов осуществляли по методу ТСХ на пластинках Sorbfil (АО «Сорбполимер», РФ). Для разделения сфинголипидов использовали систему 1 (CH₃CH₂OCH₂CH₃) и систему 2 (CHCl₃:CH₃OH:H₂O, 40:10:1 по объемам). Хроматографические пятна липидов проявляли в парах йода и идентифицировали, сравнивая со стандартами. Содержание СФМ в пробах определяли по методу Бартлета [16]. Для количественного определения содержания церамида в тканях пятна липидов переносили в пробирки и элюировали смесью хлороформа с метанолом (1:1, об./об.) с последующим элюированием метанолом [19]. Объединенные элюаты выпаривали в вакууме и подвергали гидролизу в 0.5 М р-ре HCl в метаноле при 65 °С в течение 15 ч. Массу церамидов определяли по высвобождению длинноцепочечных оснований в ходе гидролиза липидов. Числовые данные представлены ниже в виде средних значений ± ошибка среднего. Статистическую обработку выполняли с использованием критериев *t* Стьюдента и U Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ранее проведенных исследованиях было установлено, что семидневный нейрогенный стресс в условиях наших опытов обуславливал существенное снижение горизонтальной и вертикальной двигательной активности, повышал количество эмоциональных проявлений и увеличивал задержку выхода из центра поля [16]. На восьмой день после прекращения стрессирования характеристики поведения крыс в открытом поле в целом были весьма близки к таковым через сутки после прекращения действия стресса. После введения животным препарата имипрамина в течение 14 дней начиная

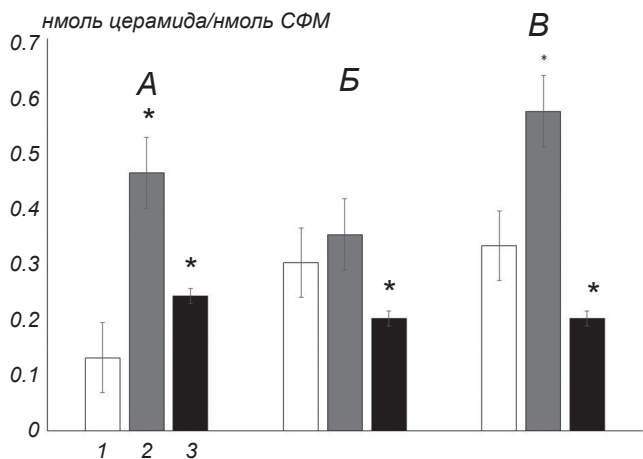
с первого дня стрессирования почти все исследуемые характеристики поведения крыс в открытом поле приближались к исходным показателям в норме (контроле) и в целом существенно не отличались от их значений до начала стрессирования



Р и с. 1. Показатели поведения крыс в тесте открытого поля после хронического нейрогенного стресса, индуцированного на фоне курсового введения имипрамина.

A – общая моторная активность (количество пересеченных квадратов + количество стоек); *B* – количество пересеченных квадратов; *B* – количество стоек; *Г* – количество выходов в центр поля; *Д* – количество эмоциональных проявлений (актов дефекации и уринации); *Е* – латентный период выхода из центра поля. 1 – контрольные значения (до начала стрессирования), 2 – показатели на восьмой день после прекращения стрессирования и 14-дневного цикла введения имипрамина.

Р и с. 1. Показники поведінки щурів у тесті відкритого поля після хронічного нейрогенного стресу, індукованого на тлі курсового введення іміпраміну.



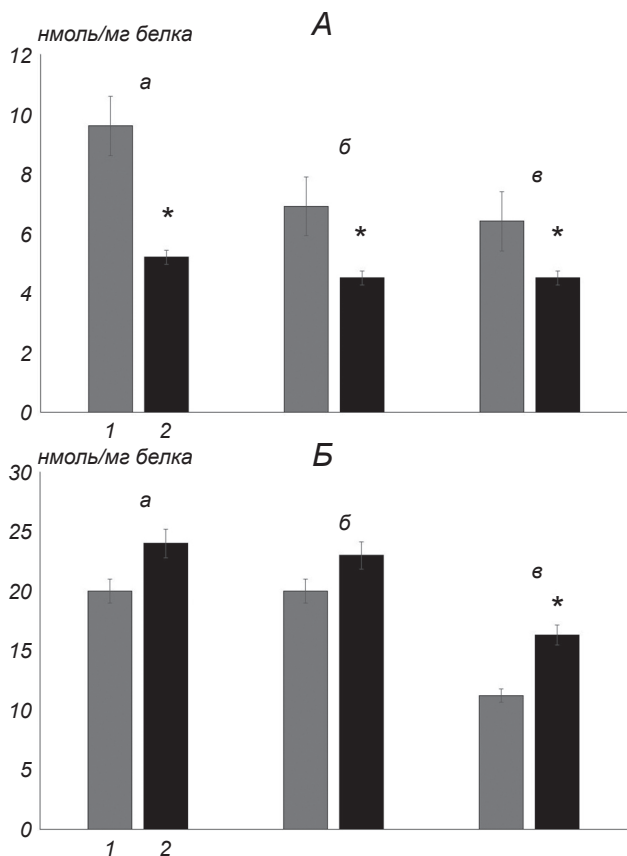
Р и с. 2. Влияния хронического нейрогенного стресса и введения имипрамина на отношение церамид/сфингомиелин (СФМ) в неокортексе (А), печени (Б) и сыворотке крови (В) крыс. 1 – контроль, 2 – на восьмой день после прекращения изолированного стрессирования и 3 – на восьмой день после прекращения стрессирования, комбинированного с 14-дневным курсом введения имипрамина. Звездочками отмечены случаи статистически значимых различий при сравнении с контролем ($P < 0.05$).

Р и с. 2. Впливи хронічного нейрогенного стресу та введення імипраміну на відношення церамід/сфінгомієлін у неокортексі (А), печінці (Б) і сироватці крові (В) щурів.

(рис. 1).

Содержание сфинголипидов в тканях мозга и периферических тканях в контроле и после стрессирования определяли в пробах тканей неокортекса, печени и сыворотке крови крыс на восьмой день после прекращения действия стресса, т. е. через одни сутки после последнего введения имипрамина (или растворителя в контроле). Как оказалось, в условиях наших экспериментов хронический ней-

рогенный стресс обуславливал существенные изменения соотношения церамида и СФМ в неокортексе и сыворотке крови, тогда как в печени крыс этот параметр изменялся незначительно (рис. 2). У стрессированных крыс отношение церамид/СФМ в неокортексе и сыворотке крови было резко увеличенным, составляя примерно 350 и 170 % аналогичного показателя у контрольных крыс соответственно. Следует отметить, что введение растворителя имипрамина (физиологического раствора NaCl) контрольным животным и крысам, подвергавшимся воздействию стресса, не влияло на отношение церамид/СФМ в соответствующих группах животных (данные не представлены). В то же время 14-дневное введение стрессированным крысам имипрамина обуславливало снижение соотношения церамид/СФМ в неокортексе, печени и сыворотке крови до значений, равнявшихся соответственно 53, 59 и 35 % аналогичных значений у крыс, подвергнутых изолированному воздействию стресса. Введение имипрамина на фоне действия хронического нейрогенного стресса обуславливало снижение уровня церамида во всех изученных тканях (рис. 3, А) и существенное повышение уровня СФМ в сыворотке

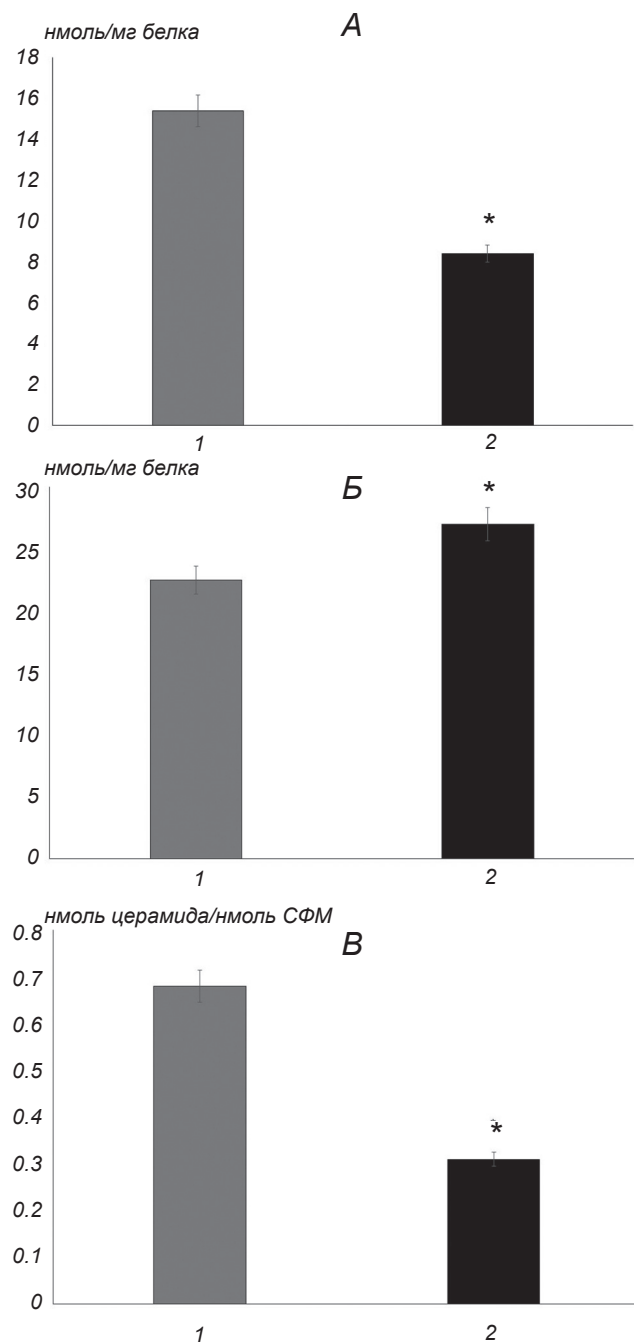


Р и с. 3. Влияние имипрамина на уровни церамида (А) и сфингомиелина (Б) в неокортексе (а), печени (б) и сыворотке крови (в) стрессированных крыс.

1 – на восьмой день после прекращения изолированного стрессирования (стресс-контроль) и 2 – на восьмой день после прекращения стрессирования на фоне 14-дневного курса введения имипрамина (опыт). Звездочками отмечены случаи статистически значимых различий при сравнении крыс опытной и контрольной групп ($P < 0.05$).

Р и с. 3. Вплив імипраміну на рівні цераміду (А) та сфінгомієліну (Б) у неокортексі (а), печінці (б) і сироватці крові (в) стресованих щурів.

крови (Б). При этом, однако, увеличение содержания СФМ в неокортексе и печени стрессированных крыс, получавших имипрамин, по сравнению с таковым в группе крыс, подвергнутых воздействию одного стресса, проявлялось лишь на уровне тенденции (Б). В то же время инкубация проб неокортекса стрессированных крыс в присутствии имипрамина сопровождалась почти двукратным снижением уровня церамида (рис. 4, А) и значения отношения церамид/СФМ (С); содержание же СФМ в ткани увеличивалось весьма незначительно (Б).



ОБСУЖДЕНИЕ

Как было установлено, стресс различных видов приводит к многочисленным и разносторонним изменениям в организме животных. Заметным модификациям подвергаются функциональные характеристики различных подразделений ЦНС и поведение стрессированных животных. Ощутимо изменяется даже такая базисная характеристика, как композиция различных компонентов плазматических мембран клеток практически всех тканей. В ранее проведенных исследованиях было установлено, что хронический нейрогенный стресс приводит к нарушению баланса различных сфинголипидов в структурах мозга. В таких условиях в мозгу экспериментальных крыс повышается отношение церамид/СФМ, что отчетливо проявляется на следующий день после прекращения стрессирования; указанный эффект сохраняется как минимум неделю [16]. Это сопровождается развитием у данных крыс устойчивого состояния эмоционального напряжения/перенапряжения и характерных признаков ДПС, проявляющихся в модификациях их поведения.

СФМ – основной сфинголипид плазматических мембран клеток и одновременно источник церамида. Последний, как известно, фактически является комплексом близких по молекулярной структуре соединений – эфиров сфингозина и ряда жирных кислот. Церамид (точнее, как только что упоминалось, церамиды) представляет собой важный компонент мембранных липидных рафтов, и увеличение его уровня сопровождается усиленным формированием липидных платформ в клеточных мембранах. Такие изменения структуры мембран коррелируют с развитием окислительного стресса и воспалительных процессов; подобные изменения в конце концов могут приводить к реализации программы гибели клеток. В свою очередь, окислительный стресс и возрастание уровня цитокинов индуцируют интенсификацию продукции церамида в клетках в результате активации кислых и

Р и с. 4. Влияние курсового введения имипрамина на уровни церамида (А), сфингомиелина – СФМ (Б) и отношения церамид/СФМ (В) в изолированных срезах неокортекса стрессированных крыс. Обозначения те же, что и на рис. 3.

Р и с. 4. Вплив курсового введення іміпраміну на рівні цераміду (А), сфінгомієліну – СФМ (Б) і відношення церамід/СФМ (В) в ізольованих зрізах неокортексу стресованих шурів.

нейтральных СФМаз (кСФМаз и нСФМаз) и усиление деградации СФМ. Индуцированное хроническим стрессом повышение уровня катехоламинов и глюкокортикоидов и возрастание продукции провоспалительных цитокинов (интерлейкина 1 β и фактора некроза опухолей α [21]) неизбежно сопровождаются развитием оксидативного стресса и часто ведут к развитию ДПС или собственно депрессивного состояния [20]. Поэтому логично полагать, что состояние СФМаз играет важную роль в изменении соотношения церамид/СФМ в мозгу. Оба энзима (и кСФМаза, и нСФМаза), участвуют в поддержании определенных физиологически адекватных уровней церамида и СФМ и количественного соотношения этих соединений в неокортексе и гиппокампе крыс [22]. Окислительный стресс индуцирует транслокацию лизосомальной кСФМазы на наружные поверхности плазматических мембран клеток, что приводит к активации гидролиза СФМ и возрастанию продукции церамида [9]. В то же время упомянутые выше интерлейкин 1 β и фактор некроза опухолей α активируют в клетках и кСФМазу, и нСФМазу [23–25]. Для трансгенных животных с избыточной экспрессией кСФМазы характерно накопление церамида в гиппокампе. При этом у них подавлены нейрогенез и созревание нейронов и снижена их выживаемость [26], т. е. проявляются феномены, характерные для ДПС [27, 28]. В то же время для мышей с дефицитом кСФМазы характерны пониженный уровень церамида в гиппокампе, менее выраженная тревожность и меньшая интенсивность поведенческих проявлений, присущих ДПС [26]. Введение трансгенным крысам и крысам дикого типа антидепрессанта фендилина, который является функциональным ингибитором кСФМазы [29, 30], ослабляет эффекты непредсказуемого хронического стресса, а у мышей подавляет индуцированные введением кортикостерона поведенческие реакции, свойственные ДПС [26]. Цитированные авторы высказали предположение о ключевой роли уровня активности кСФМазы в развитии ДПС у стрессированных животных. В то же время, естественно, нельзя исключить, что и другие ферменты, участвующие в регуляции уровня церамидов в клетках, вовлечены в этот процесс. Так, установлено, что введение ингибитора нСФМазы сфинголактона-24 в значительной степени имитирует действие антидепрессантов на организм [31]. У мышей со сниженной экспрессией церамидазы, катализирующей деградацию церамида до сфингозина, повышался уровень церамида в гиппокам-

пе; при этом подавляются нейрогенез и созревание нейронов, усиливается их гибель и возрастают проявления ДПС [26]. Введение животным ингибитора гликозилирования церамида D,L-трео-1-фенил-2-деcanoиламино-3-морфолино-1-пропранолола приводило к двукратному увеличению содержания церамида, подавляло нейрогенез и созревание нейронов в гиппокампе и индуцировало развитие симптомов ДПС как у мышей дикого типа, так и у мышей с дефицитом кСФМазы [26]. Было обнаружено, что спонтанный и генетически обусловленный дефицит церамидсинтазы-1 вызывает снижение общего содержания церамидов в мозгу, падение уровня такого компонента, как С18-церамид, при увеличении содержания С16-церамида в мозгу. Все это сопровождалось снижением локомоторной активности, изменениями показателей тревожности в тесте открытого поля и нарушением способности животных к обучению и формированию памятных следов [32, 33].

Пытаясь выяснить причины изменений уровня церамида в мозгу при действии хронического нейрогенного стресса, мы изучали особенности содержания СФМ и церамида в неокортексе, печени и сыворотке крови; дополнительным фактором было длительное воздействие на организм стрессированных крыс функционального ингибитора кСФМазы имипрамина. Имипрамин известен как антидепрессант, обладающий способностью эффективно ингибировать лизосомальную кСФМазу. Накапливаясь в клетках, этот антидепрессант препятствует контактам кСФМазы с внутренней поверхностью мембран лизосом, что сопровождается протеолитической деградацией фермента и подавлением его активности [15]. Для того чтобы препарат аккумулировался в гиппокампе, неокортексе, печени и других тканях организма и реализовал свое влияние на кСФМазу, необходимо курсовое введение имипрамина животным в течение не менее чем двух недель [34].

Как показали результаты наших экспериментов, двухнедельное введение данного препарата стрессированным крысам не только обуславливало значительное изменение содержания церамида в изученных тканях, но и модифицировало поведение животных в открытом поле. В период последующего действия нейрогенного стресса курсовое введение имипрамина предупреждало развитие поведения, характерного для ДПС, ослабляя угнетение поисково-двигательной активности и уменьшая проявления повышенной эмоциональности (реакции страха). Это выражалось в усилении посещаемости

центра поля, менее отчетливых изменениях числа актов локомоции, стоек, количества актов дефекации и уринации и сокращения латентного периода выхода из центра поля. Приближение почти всех исследуемых характеристик поведения в открытом поле к исходным показателям у крыс опытной группы в целом свидетельствует о протективном и антидепрессивном эффектах имипрамина. Антидепрессивные эффекты этого препарата могут быть связаны с его влиянием через имипраминовые рецепторы на структуры лимбической системы мозга, в частности гиппокамп [35, 36] и неокортекс [37]. Полагают, что эффекты данного антидепрессанта обусловлены влияниями на тормозные серотонинергические и норадренергические механизмы указанных выше церебральных структур, а также на дофаминергические рецепторы [36, 38]. Предполагается также, что эффекты трициклических антидепрессантов в ходе лечения депрессивных состояний в значительной степени опосредованы ингибированием кСФМазы и ослаблением продукции церамида. При этом подавлялись транспорт серотонина с участием его транспортера и обратный захват серотонина [39].

Наши результаты свидетельствуют о том, что имипрамин существенно снижает содержание церамида и отношение церамид/СФМ в неокортексе, печени и сыворотке крови стрессированных крыс. Полученные результаты позволяют предположить, что лизосомальная кСФМаза в существенной мере задействована в обусловленное стрессом накопление церамида и изменение поведения стрессированных животных в открытом поле. В то же время под действием имипрамина содержание субстрата СФМаз (СФМ) в печени и неокортексе изменяется слабо, притом как его уровень в сыворотке крови стрессированных крыс, подвергнутых воздействию имипрамина, значительно повышается. Учитывая то, что антидепрессанты ингибируют только лизосомальную, но не секретлируемую кСФМазу, участие последней формы фермента в индуцированном имипрамино снижении уровня церамида и повышении содержания СФМ в сыворотке крови можно исключить. Под действием имипрамина в печени подавление активности кСФМазы, скорее всего, сопровождается синтезом липопротеидов со сниженным количеством церамида и повышенным количеством СФМ. Транспорт в кровь таких липопротеидов усиливается, что приводит к значительному снижению отношения церамид/СФМ в сыворотке крови. Поскольку в мозгу в деградацию СФМ вовлече-

ны как кСФМаза, так и нСФМазы [22], а имипрамин способен ингибировать только лизосомальную кСФМазу, но не нСФМазу [40], следует полагать, что незначительные изменения содержания СФМ в неокортексе под действием этого антидепрессанта связаны именно с деградацией СФМ, опосредованной нСФМазой. Строгие доказательства участия СФМаз в индуцированном хроническим нейрогенным стрессом изменении уровня церамида в мозгу были получены *in vitro* при непосредственном воздействии имипрамина на изолированные препараты (срезы неокортекса стрессированных крыс). В наших условиях имипрамин значительно снижал содержание церамида и отношение церамид/СФМ в коре на фоне небольшого повышения уровня субстрата СФМаз (СФМ).

Таким образом, мы показали, что имипрамин является весьма эффективным модулятором содержания церамида как в мозгу, так и в периферических тканях (печени и сыворотке крови) в условиях действия на организм хронического нейрогенного стресса. Применение данного функционального ингибитора кСФМазы позволило выявить важную роль лизосомального пула этого фермента в изменении содержания церамида в мозгу (в частности, в неокортексе) и развитии ДПС у крыс под действием нейрогенного стресса. В то же время вклад нСФМазы в изменения уровня церамида в мозгу и печени стрессированных животных, видимо нельзя исключать полностью.

Полученные данные позволяют полагать, что активация СФМаз в печени стрессированных животных приводит к деградации СФМ, накоплению церамида, синтезу липопротеинов, обогащенных последним, и их транспорту в кровь и мозг. Учитывая то, что имипрамин не только нормализует содержание сфинголипидов в тканях стрессированных крыс, но и одновременно ослабляет нарушения поведения животных, можно предположить, что изменения уровня церамида и СФМ в сыворотке крови являются важным показателем эффективности действия антидепрессантов в условиях хронического стресса и развития ДПС.

Все исследования на животных проводили с соблюдением международных принципов, изложенных в Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1985), и в национальных документах, касающихся этических принципов экспериментов на животных (Украина, 2001).

Авторы настоящей работы – Н. А. Бабенко, В. М. Шеверева и В. В. Гарькавенко – подтверждают, что в ходе исследования не возникали конфликты любого рода, касающиеся коммерческих или финансовых отношений, отношений с организациями или лицами, которые каким-либо образом могли быть связаны с исследованием, а также взаимоотношений соавторов статьи.

Н. О. Бабенко¹, В. М. Шеверьева¹, В. В. Гарькавенко¹

ПОРУШЕННЯ БАЛАНСУ СФІНГОЛІПІДІВ У ТКАНИНАХ І МОДИФІКАЦІЇ ПОВЕДІНКИ ЩУРІВ ПІД ДІЄЮ НЕЙРОГЕННОГО СТРЕСУ: РОЛЬ ЗМІН АКТИВНОСТІ СФІНГОМІЄЛІНАЗ

¹Науково-дослідний інститут біології Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна (Україна).

Резюме

Досліджували зміни вмісту кераміду та сфінгомієліну (СФМ) у неокортексі та периферичних тканинах щурів після ізольованої дії тривалого нейрогенного стресу (сім щоденних сеансів ноцицептивної стимуляції в клітці з електрифікованою підлогою) та після подібного стресу, індукованого на тлі курсового (14-денного) введення трициклічного антидепресанта іміпраміну (функціонального інгібітора кислоти сфінгомієлінази – кСФМазі). Вплив іміпраміну в істотній мірі перешкоджав розвитку депресіоподібного стану (ДПС): послаблювалося пригнічення пошуково-рухової активності, зменшувалися прояви «емоційних» феноменів (актів дефекації та уринації), ставав меншим латентний період виходу з центра поля. Введення стресованим тваринам іміпраміну зумовлювало зниження відношення керамід/СФМ і рівнів кераміду в неокортексі, печінці та сироватці крові; вміст СФМ у сироватці крові дещо підвищувався порівняно з відповідними показниками у щурів, підданих ізольованій дії стресу. Подібні зміни вмісту сфінголіпідів відбувались і при безпосередній дії іміпраміну на ізольовані зрізи неокортексту стресованих щурів. Отримані результати свідчать про важливу роль рівня активності кСФМазі в змінах відношення керамід/СФМ у неокортексі щурів і відповідні модифікації їх поведінки. Рівні сфінголіпідів у сироватці крові можуть бути важливим показником ефективності дії антидепресантів в умовах хронічного стресу та розвитку ДПС.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. C. Tardy, P. Codogno, H. Autefage, et al., "Lysosomes and lysosomal proteins in cancer cell death (new players of an old struggle)," *Biochim. Biophys. Acta*, **1765**, 101-125 (2006).
2. S. L. Schissel, E. H. Schuchman, K. J. Williams, et al., "Zn²⁺-stimulated sphingomyelinase is secreted by many cell types and is a product of the acid sphingomyelinase gene," *J. Biol. Chem.*, **271**, 18431-18436 (1996).
3. S. Jin, F. Yi, F. Zhang, et al., "Lysosomal targeting and trafficking of acid sphingomyelinase to lipid raft platforms in coronary endothelial cells," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **28**, 2056-2062 (2008).
4. Y. A. Hannun and C. Luberto, "Ceramide in the eukaryotic stress response," *Trends Cell Biol.*, **10**, 73-80 (2000).
5. A. Charruyer, S. Grazide, C. Bezombes, et al., "UV-C light induces raft-associated acid sphingomyelinase and JNK activation and translocation independently on a nuclear signal," *J. Biol. Chem.*, **280**, 19196-19204 (2005).
6. S. S. Castillo, M. Levy, J. V. Thaikootathil, et al., "Reactive nitrogen and oxygen species activate different sphingomyelinases to induce apoptosis in airway epithelial cells," *Exp. Cell Res.*, **313**, 2680-2686 (2007).
7. P. Santana, L. A. Peña, A. Haimovitz, et al., "Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis," *Cell*, **86**, 189-199 (1996).
8. Y. Morita, G. I. Perez, F. Paris, et al., "Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy," *Nat. Med.*, **6**, 1109-1114 (2000).
9. L. A. Peña, Z. Fuks, and R. N. Kolesnick, "Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency," *Cancer Res.*, **60**, 321-327 (2000).
10. Y. Dowlati, N. Hermann, W. Swardfager, et al., "A meta-analysis of cytokines in major depression," *Biol. Psychiat.*, **67**, 446-457 (2010).
11. Y. Liu, R. C.-M. Ho, and A. Mak, "Interleukin (IL)-6, tumour necrosis factor alpha (TNF- α) and soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) are elevated in patients with major depressive disorder: a meta-analysis and meta-regression," *J. Affect. Disord.*, **139**, 230-239 (2012).
12. J. Kornhuber, A. Medlin, S. Bleich, et al., "High activity of acid sphingomyelinase in major depression," *J. Neural. Transm.*, **112**, 1583-1590 (2005).
13. S. M. Hammad, J.-P. Truman, M. Al-Gadban, et al., "Altered blood sphingolipidomics and elevated plasma inflammatory cytokines in combat veterans with post-traumatic stress disorder," *Neurobiol. Lipids*, **10**, 2 (2012).
14. E. Gulbins, M. Palmada, M. Reichel, et al., "Acid sphingomyelinase-ceramide system mediates effects of antidepressant drugs," *Nat. Med.*, **19**, 934-938 (2013).
15. J. Kornhuber, P. Tripal, R. Martin, et al., "Functional inhibitors of acid sphingomyelinase (FIASMs): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications," *J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **26**, 9-20 (2010).
16. Н. А. Бабенко, В. М. Шеверева, В. В. Гарькавенко, "Влияние хронического нейрогенного стресса на поведение крыс и липидную композицию клеточных мембран", *Neurophysiology/Нейрофизиология*, **48**, № 5, 384-391 (2016).
17. Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон, *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*, Выш. шк., Москва (1991).
18. E. G. Blish and W. J. Dyer, "A rapid method of total lipid extraction and purification," *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917 (1959).
19. S. Sathishkumar, B. Boyanovsky, A. Karakashian, et al., "Elevated sphingomyelinase activity and ceramide concentration in serum of patients undergoing high dose spatially fractionated radiation treatment: implications for endothelial apoptosis," *Cancer Biol. Ther.*, **4**, No. 9, 979-986 (2005).

20. T. M. Michel, D. Pülschen, and J. Thome, "The role of oxidative stress in depressive disorders," *Current Pharm. Des.*, **18**, No. 36, 5890-5899 (2012).
21. A. H. Miller, "Depression and immunity: a role for T cells?" *Brain, Behav., Immunol.*, **24**, No. 1, 1-8 (2010).
22. N. A. Babenko and O. G. Shakhova, "Long-term food restriction prevents aging-associated sphingolipid turnover dysregulation in the brain," *Arch. Gerontol. Geriatr.*, **58**, No. 3, 420-426 (2014).
23. D. Wheeler, E. Knapp, V. V. Bandaru, et al., "Tumor necrosis factor- α -induced neutral sphingomyelinase-2 modulates synaptic plasticity by controlling the membrane insertion of NMDA receptors," *J. Neurochem.*, **109**, No. 5, 1237-1249 (2009).
24. N. Sanvicens and T. G. Cotter, "Ceramide is the key mediator of oxidative stress-induced apoptosis in retinal photoreceptor cells," *J. Neurochem.*, **98**, No. 5, 1432-1444 (2006).
25. N. A. Babenko, L. K. Hassouneh, V. S. Kharchenko, et al., "Vitamin E prevents the age-dependent and palmitate-induced disturbances of sphingolipid turnover in liver cells," *Age*, **34**, No. 4, 905-915 (2012).
26. E. Gulbins, M. Palmada, M. Reichel, et al., "Acid sphingomyelinase-ceramide system mediates effects of antidepressant drugs," *Nat. Med.*, **19**, No. 7, 934-938 (2013).
27. V. Krishnan and E. J. Nestler, "The molecular neurobiology of depression," *Nature*, **455**, No. 7215, 894-902 (2008).
28. L. Santarelli, M. Saxe, C. Gross, et al., "Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants," *Science*, **301**, No. 5634, 805-809 (2003).
29. J. Kornhuber, J. Muehlbacher, S. Trapp, et al., "Identification of novel functional inhibitors of acid sphingomyelinase," *PloS One*, **6**, No. 8, e23852 (2011), doi:10.1371/journal.pone.0023852.
30. J. Kornhuber, P. Tripal, M. Reichel, et al., "Functional Inhibitors of acid sphingomyelinase (FIASMs): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications," *Cell. Physiol. Biochem.*, **26**, No. 1, 9-20 (2010).
31. H.-C. Su, C.-T. Ma, C.-F. Lin, et al., "The acid sphingomyelinase inhibitors block interferon- α -induced serotonin uptake via a COX-2/Akt/ERK/STAT-dependent pathway in T cells," *Int. Immunopharmacol.*, **11**, No. 11, 1823-1831 (2011).
32. C. Ginkel, D. Hartmann, D. K. Vom, et al., "Ablation of neuronal ceramide synthase 1 in mice decreases ganglioside levels and expression of myelin-associated glycoprotein in oligodendrocytes," *J. Biol. Chem.*, **287**, 41888-41902 (2012).
33. L. Zhao, S. D. Spassieva, T. J. Jucius, et al., "A deficiency of ceramide biosynthesis causes cerebellar purkinje cell neurodegeneration and lipofuscin accumulation," *PloS Gen.*, **7**, e1002063 (2011).
34. V. V. Garkavenko, G. V. Storozhenko, O. N. Krasnikova, et al., "Correction of age-related disorders of sphingolipid content in rat tissues by acid sphingomyelinase inhibition," *Int. J. Physiol. Pathophysiol.*, **3**, 281-286 (2012).
35. П. В. Сергеев, Н. Л. Шимановский, *Рецепторы физиологически активных веществ*, Медицина, Москва (1987).
36. Э. Б. Арушанян, Э. В. Бейер, "Место гиппокампа в биоритмологической организации поведения", *Успехи физиол. наук*, **32**, № 1, 79-95 (2001).
37. T. M. Felton, T. B. Kang, S. Hjorth, and S. B. Auerbach, "Effects of selective serotonin and serotonin/ noradrenalin reuptake inhibitor on extracellular serotonin in rat diencephalons and frontal cortex," *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **367**, No. 3, 297-305 (2003).
38. R. Anwyl and M. J. Rowan, "Frequency-dependent block of field potential in the rat hippocampal slice caused by tricyclic antidepressants," *Brit. J. Pharmacol.*, **86**, No. 1, 201-208 (1985).
39. J. Kornhuber, P. Tripal, R. Martin, et al., "The role of ceramide in major depressive disorder," *Eur. Arch. Psychiat. Clin. Neurosci.*, **259**, No. 2, S199-S204 (2009).
40. N. A. Babenko and V. S. Kharchenko, "Effects of inhibitors of key enzymes of sphingolipid metabolism on insulin-induced glucose uptake and glycogen synthesis in liver cells of old rats," *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 104-112 (2015).