

В.В. Гарькавенко, Г.В. Стороженко, О.М. Краснікова, Н.О. Бабенко

Корекція вікових порушень вмісту сфінголіпідів у тканинах щурів за допомогою інгібування кислоти сфінгомелінази

Оскільки зниження вмісту сфінгомеліну та накопичення керамиду в клітинах у старості пов'язані з розвитком деяких патологічних станів, актуальним є пошук шляхів нормалізації обміну сфінголіпідів. Враховуючи те, що кислота сфінгомеліназа є ключовим ферментом сфінголіпідів, ми вивчали вплив інгібітора кислоти сфінгомелінази на вміст керамиду та сфінгомеліну у тканинах старих щурів. Введення меліпраміну викликає підвищення вмісту сфінгомеліну та зниження співвідношення керамид/сфінгомелінін у печінці, серці та головному мозку старих щурів. Найбільш чутливим до впливу меліпраміну є гіпокамп. Отримані результати свідчать про те, що меліпрамін є ефективним модулятором вмісту сфінголіпідів. Вікові зміни вмісту керамиду та сфінгомеліну у тканинах багато в чому визначаються активацією кислоти сфінгомелінази у процесі старіння.

Ключові слова: сфінгомелінін, керамид, сфінгомеліназа, меліпрамін, старіння.

ВСТУП

Відомо, що сфінголіпіди – важливі структуроутворювальні фосfolіпіди мембран, метаболіти яких відіграють роль медіаторів клітинного сигналу у процесах апоптозу, проліферації, клітинної міграції, регуляції тону судин, розвитку атеросклерозу, що зумовлено їх участю у формуванні рафтів – мембранних мікродоменів [1]. Існує тісна інтеграція у метаболізмі та мембранній локалізації сфінголіпідів і холестерину – ще одного важливого компонента рафтів [8]. Сфінголіпіди сфінгомелінін (СФМ) і його метаболіт керамид (ЦЕР) ушільнюють ділянку рафта та сприяють кластеризації таких її рецепторів, як CD95/Fas. Вплив СФМ і ЦЕР на кластеризацію мембранних білків може бути ключовим у розвитку апоптотичних сигналів. Однак встановлено, що крім структурування рецепторних білків, ЦЕР, поряд із деякими іншими активними метаболітами СФМ, може і сам бути вторинним месенджером [1, 8].

Практично будь-який стресорний стан у клітинах різноманітних тканин еукариотних організмів супроводжується альтераціями в обміні СФМ, і, зокрема, накопиченням ЦЕР [8, 9]. Крім синтезу ЦЕР de novo в мітохондріях та ендоплазматичному ретикулумі за участю керамідсинтази, значна його частина є продуктом деградації мембранного СФМ групою ферментів сфінгомеліназ (СФМаз). Основна маса ЦЕР у клітині утворюється внаслідок дії кислоти СФМазі [КФ-3.1.4.12]. Відзначається, що зміщення балансу в обміні сфінголіпідів у бік накопичення ЦЕР може призводити до індукції апоптозу як через кластеризацію рецепторів, задіяних у передачі апоптотичних сигналів на мембрані, так і за рахунок активації каспаз, що призводить до утворення мітохондріальних пор. Водночас накопичення СФМ, зниження співвідношення ЦЕР/СФМ, а також утворення сфінгозин-1-фосфату внаслідок деградації ЦЕР, навпаки, може стимулювати процеси проліферації та підвищення

© В.В. Гарькавенко, Г.В. Стороженко, О.М. Краснікова, Н.О. Бабенко

життєздатності клітин [1, 8, 9, 15].

Встановлено, що накопичення ЦЕР та підвищення співвідношення ЦЕР/СФМ, що відбувається в різних типах клітин старіючого організму, може призводити до розвитку такої вікової патології, як хвороба Альцгеймера. Ключовим ферментом регуляції співвідношення ЦЕР/СФМ вважається кисла СФМаза, надмірна активація якої призводить до підвищення вмісту ЦЕР, а зниження її активності може спричинити синдром Німана – Піка внаслідок накопичення сфінгомієліну у лізосомах [1, 3, 4, 10]. Водночас механізми вікового порушення функціонування сфінгомієлінового циклу залишаються неостаточно з'ясованими.

Згідно з останніми дослідженнями, підвищення активності кислої СФМази в різних тканинах є характерним також для депресивних станів людини. Так, Kornhuber і співавт. [11] встановили підвищення активності кислої СФМази у мононуклеарних клітинах периферичної крові пацієнтів з депресивними психічними розладами. Антидепресанти меліпрамін (іміпрамін, дисіпрамін) та амітриптилін є ефективними інгібіторами кислої СФМази [7, 9, 11]. Саме пригнічення активності СФМази і зміна співвідношення сфінголіпідів може відігравати ключову роль у корекції депресивних станів при клінічному застосуванні меліпраміну та амітриптиліну. Вважають, що меліпрамін інгібує активність СФМази через порушення її зв'язку з негативно зарядженими ліпідами лізосомальних мембран, після чого СФМаза піддається протеолізу. Jenkins та співавт. [9] на клітинах MCF7 продемонстрували дозозалежне пригнічення активності кислої СФМази дисіпраміном (меліпраміном) в експериментах як *in vivo*, так і *in vitro*.

Відомо, що введення меліпраміну та аналогічних йому антидепресантів – блокторів кислої СФМази здоровим тваринам може імітувати ефекти, які спостерігаються у тварин з природженою її відсутністю.

Також, встановлено що меліпрамін пригнічує індукцію апоптозу фактором некрозу пухлин (ФНП- α) в гепатоцитах щурів і мишей. Показано, що ЦЕР, що виробляється у клітині під дією ФНП- α , може відігравати роль вторинного месенджера, активуючого каспази, які запускають апоптоз. Підвищення активності СФМази під дією ФНП- α також порушує нормальне співвідношення ЦЕР/СФМ у клітинах. Відзначається, що меліпрамін пригнічує активність кислої СФМази, порушуючи деградацію СФМ до ЦЕР, внаслідок чого гепатоцити набувають стійкості до дії ФНП [14].

Дані літератури [7, 9, 11] щодо здатності меліпраміну інгібувати кислу СФМазу дають змогу припустити можливість корекції за допомогою цього препарату вікових порушень обміну сфінголіпідів, що мають велике значення у розвитку вікових патологій. Тому метою нашої роботи була корекція вікових змін у тканинах старих щурів лінії Вістар через інгібування кислої СФМази за допомогою меліпраміну.

МЕТОДИКА

Дослідження виконані на 18 старих (24-місячних) щурах-самцях лінії Вістар [7]. Дослідні тварини отримували внутрішньом'язові ін'єкції меліпраміну у дозі 10 мг/кг протягом 7 або 14 діб, яка є оптимальною для пригнічення активності кислої СФМази. Контрольна група щурів у ці самі терміни отримувала внутрішньом'язово ін'єкцію 0,9%-го розчину NaCl. Тварин декапітували під ефірним наркозом. Екстракцію фосфоліпідів з гіпокампа та великих півкуль головного мозку, печінки та серця здійснювали за методом Bligh, Dyer [6]. Розподіл ліпідів на фракції проводили методом одномірної хроматографії в тонкому шарі силікагелю (пластини "Sorbfil", Росія). Наявність ліпідів виявляли у випарах йоду та ідентифікували за допомо-

гою стандартів [2]. Кількісний вміст сфінголіпідів у хроматографічних фракціях визначали за неорганічним фосфором [5]. Вміст білка в суспензіях мозку, печінки та серця визначали за методом Lowry та співавт. [12]. Результати експериментів представлені як середнє арифметичне \pm стандартна помилка. Для порівняння значень вмісту ліпідів контрольної та дослідних груп використовували однофакторний дисперсійний аналіз one-way Anova, за критерієм Фішера, та для порівняння вмісту білка в дослідних групах – критерій t Стьюдента. Відмінності між групами вважали статистично достовірними при $P < 0,05$.

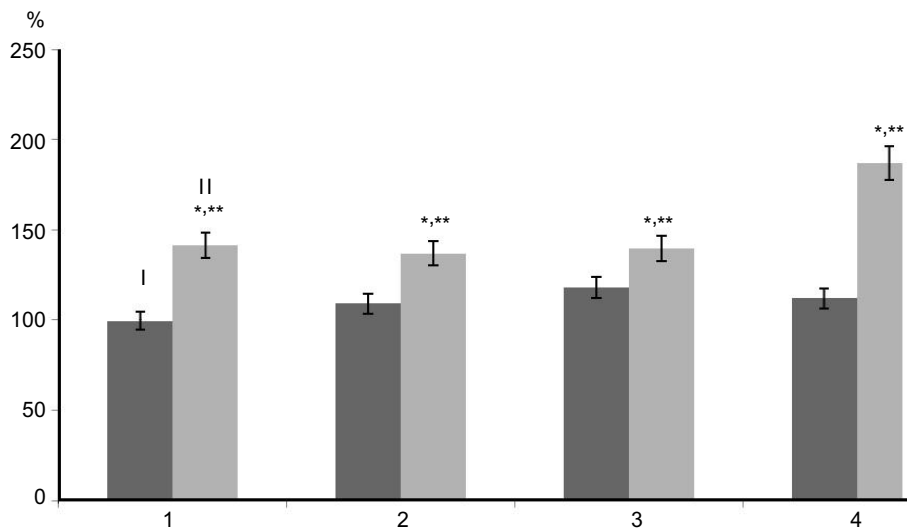
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час 7-добового введення дослідним щурам меліпраміну спостерігалася лише тенденція до підвищення вмісту СФМ у тканинах головного мозку і печінки відносно контрольної групи (рисунок). Водночас більш тривале введення препарату (14 діб) індукувало достовірне підвищення цього показника як у тканинах печінки та головного мозку, так і в серці (див. рисунок). Найбільший ефект спостерігався в гіпо-

кампі, де вміст СФМ підвищився на 186 % щодо значень у контрольній групі. Отримані результати можуть свідчити про пригнічувальну дію меліпраміну на гідроліз СФМ. Це узгоджується з даними сучасних досліджень, що демонструють ефективне пригнічення меліпраміном активності кислотої СММази у печінці, ізольованих гепатоцитах, мононуклеарних клітинах крові, ізольованих тканинах серця та артерій [7, 16].

У нашій роботі не спостерігалось достовірних змін співвідношення ЦЕР/СФМ у гіпокампі, неокортексі, тканинах печінки та серця щурів після 7-добового введення препарату (таблиця), а після 14-добового впливу воно знижувалося, що на тлі зростаючого в часі накопичення СФМ може свідчити про пригнічення активності кислотої СФМази.

Зміна співвідношення ЦЕР/СФМ у клітинах може бути важливим показником зміни активності СФМази. Підвищення співвідношення ЦЕР/СФМ у клітинній мембрані може викликати збільшення чутливості клітини до апоптотичних сигналів, а відносно підвищення вмісту ЦЕР може індукувати загибель клітини як за апоптотичним, так і за некротичним шляхом [2, 3, 8]. Так, порушення нормаль-



Вплив меліпраміну на вміст сфінгомеліну у тканинах 24-місячних щурів: 1 – серце, 2 – печінка, 3 – кора півкуль головного мозку, 4 – гіпокамп. I – 7 діб, II – 14 діб. * $P < 0,05$ щодо контролю, ** $P < 0,05$ щодо значень у тварин, які отримували препарат упродовж 7 діб

Вплив меліпраміну на відношення цераміду до сфінгомієліну у тканинах 24-місячних щурів

Тканина	7 діб		14 діб	
	Контроль	Меліпрамін	Контроль	Меліпрамін
Печінка	0,65 ± 0,05	0,66 ± 0,07	0,64 ± 0,05	0,56 ± 0,02 ***
Серце	1,01 ± 0,10	1,24 ± 0,10	0,93 ± 0,07	0,75 ± 0,06 ***
Неокортекс	1,07 ± 0,07	1,08 ± 0,08	0,59 ± 0,05	0,42 ± 0,03 ***
Гіпокамп	0,60 ± 0,05	0,60 ± 0,09	0,78 ± 0,05	0,48 ± 0,02 ***

*P<0,05 порівняно з контролем, **P <0,05 порівняно зі впливом меліпраміну протягом 7 діб.

ного співвідношення ЦЕР/СФМ у клітинах печінки на фоні підвищеної активності СФМази може призводити до розвитку стеатозів різної етіології (жирової дистрофії печінки) та відіграє важливу роль в ураженні печінки при гепатитах. Подібні порушення обміну сфінголіпідів у нервових клітинах відповідно до сучасних досліджень можуть бути причиною такої вікової патології, як хвороба Альцгеймера [8]. Zhang і співавт. [16], висловлюють припущення щодо зв'язку підвищеної СФМазної активності в ендотеліальних клітинах серця і великих судин з розвитком різноманітних патологій серцево-судинної системи. У попередніх наших працях показано підвищення вмісту ЦЕР у різних тканинах (зокрема, старіючого організму) і підвищення співвідношення ЦЕР/СФМ у печінці та гіпокампі старих тварин [3, 4].

Відомо, що зниження співвідношення ЦЕР/СФМ у клітинах сприяє підвищенню життєздатності клітин різних тканин, зниженню чутливості CD-95/Fas-рецепторів, а також сприйнятливості клітин до впливу апоптотичних сигналів, наприклад, ФНП- α [2, 8, 9, 16]. Підвищення життєздатності клітин може перешкоджати розвитку деяких патологій печінки та головного мозку, викликаних посиленням апоптотичних процесів.

Численними дослідженнями показано, що меліпрамін та аналогічні йому трициклічні антидепресанти вибірково інгібують кислу, але не нейтральну СФМазу [10, 11, 14]. Отримані в нашій роботі під впливом меліпраміну значні та прогресуючі у часі підвищення вмісту СФМ і зниження співвідношення ЦЕР/СФМ у печінці, мозку та

серці відносно контролю, можуть свідчити про успішну корекцію вікових змін у різних тканинах старих тварин.

Таким чином, слід зазначити, що меліпрамін є ефективним регулятором вмісту СФМ і ЦЕР у тканинах старих щурів. Дія препарату щодо вмісту сфінголіпідів може бути пов'язана з його здатністю пригнічувати активність кислої СФМази і залежить від тривалості його застосування. Найбільш інтенсивні зміни в обміні сфінголіпідів, що проявляються у збільшенні вмісту СФМ і зниженні співвідношення ЦЕР/СФМ, спостерігаються при тривалому, протягом 14 діб, введенні препарату старим тваринам. Найбільш чутливим до дії меліпраміну виявився гіпокамп, що дає змогу припустити тканинну специфічність дії препарату на обмін сфінголіпідів. Враховуючи те, що інгібітор кислої СФМази меліпрамін підвищує вміст СФМ і знижує співвідношення ЦЕР/СФМ у досліджуваних тканинах старих щурів до рівня, що спостерігається у молодих тварин [3, 4], можна заключити, що вікові зміни вмісту сфінголіпідів багато в чому визначаються активністю кислої СФМази.

**В.В. Гарькавенко, Г.В. Стороженко,
О.Н. Краснікова, Н.А. Бабенко**

КОРРЕКЦИЯ ВОЗРАСТНЫХ НАРУШЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ СФИНГОЛИПИДОВ В ТКАНЯХ КРЫС ПУТЕМ ИНГИБИРОВАНИЯ КИСЛОЙ СФИНГОМИЕЛИНАЗЫ

Поскольку снижение содержания сфингомиелина и накопление церамида в клетках в старости сопряжены с развитием ряда патологических состояний, актуальным является поиск путей нормализации обмена сфинго-

липидов. Учитывая то, что кислая сфингомиелиназа является ключевым ферментом обмена сфинголипидов в настоящей работе изучали влияние ингибитора кислой сфингомиелиназы на содержание церамида и сфингомиелина в тканях старых крыс. Введение мелипрамина вызывает повышение содержания сфингомиелина и снижение соотношения церамид/сфингомиелин, в печени, сердце и головном мозгу старых крыс. Наиболее чувствительным к воздействию мелипрамина является гиппокамп. Полученные данные свидетельствуют о том, что мелипрамин является эффективным модулятором содержания сфинголипидов. Возрастные изменения содержания церамида и сфингомиелина в тканях во многом определены активацией кислой сфингомиелиназы в процессе старения.

Ключевые слова: сфингомиелин, церамид, сфингомиелиназа, мелипрамин, старение.

**V.V. Garkavenko, G.V. Storozhenko,
O.N. Krasnikova, N.A. Babenko**

CORRECTION OF AGE-RELATED CHANGES IN SPHINGOLIPID CONTENT IN RAT TISSUES BY ACID SPHINGOMYELINASE INHIBITION

Because reduction of sphingomyelin and ceramide accumulation in aging are associated with the development of a wide variety of pathologies, finding the ways of normalizing the sphingolipid exchange is becoming actual. As the ASM is a key enzyme of the sphingolipid exchange, in the present study we have investigated the effect of an ASM inhibitor imipramine on the ceramide and sphingomyelin content in the tissues of old rats. The introduction of imipramine elevates the sphingomyelin level and reduces the ceramide/sphingomyelin ratio in the liver, heart and brain of old rats. The hippocampus is most sensitive to the imipramine effects. These data suggest that imipramine is an effective modulator of sphingolipid content in the body of old rats. The age-related changes in the ceramide and sphingomyelin content in the tissues are highly determined by the activation of acid sphingomyelinase in the process of aging.

Keywords: sphingomyelin, ceramide, sphingomyelinase, aging, imipramine.

Institute of Biology, Kharkiv Karazin National University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ипатова О.М., Торховская Т.И., Захарова Т.С. Сфинголипиды и клеточная сигнализация: участие в апоптозе и атерогенезе // Биохимия. – 2006. – 71, вып. 7. – С. 882–893.
2. Финдлей Дж. Б., Эванз У. Г. Биологические мембраны. Методы: Пер. с англ. – М.: Мир, 1990. – 424 с.

3. Babenko N., Shakhova E. Effects of Chamomilla recutita flavonoids on age-related liver sphingolipid turnover in rats // Exp. Gerontol. – 2006. – 41, № 1. – P. 32–39.
4. Babenko N.A., Semenova Y.A. Effects of long-term fish oil-enriched diet on the sphingolipid metabolism in brain of old rats // Ibid. – 2010 – 45, № 5. – P. 375–380.
5. Bartlett G.R. Phosphorus assay in column chromatography // J.Biol. Chem. – 1959. – 234, № 3. – P. 466–468.
6. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol. – 1959. – 37, № 8. – C. 911–917.
7. Deupree J.D., Reed A.L., Bylund D.B. Differential effects of the tricyclic antidepressant, desipramine, on the density of adrenergic receptors in juvenile and adult rats // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2007. – 321, № 2. – P. 770–776.
8. Hannun Y.A., Obeid L.M. The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind // J. Biol. Chem. – 2002. – 277, № 29. – P. 25847–25850.
9. Jenkins R.W., Canals D., Idkowiak-Baldys J., Simbari F., Roddy P., Perry D.M., Kitatani K., Luberto C., Hannun Y.A. Regulated secretion of acid sphingomyelinase – implications for selectivity of ceramide formation // Ibid. – 2010. – 285, № 46. – P. 35706–35718.
10. Kirschnek S., Paris F., Weller M., Grassme H., Ferlinz K., Riehle A., Fuks Z., Kolesnick R., Gulbins E. CD95-mediated apoptosis in vivo involves acid sphingomyelinase // Ibid. – 2000. – 275, № 35. – P. 27316–7323.
11. Kornhuber J, Medlin A, Bleich S, Jendrossek V, Henkel AW, Wiltfang J, Gulbins E. High activity of acid sphingomyelinase in major depression // J. Neural. Transm. – 2005. – 112. – P. 1583–1590.
12. Lowry O.N., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193. – P. 365–375.
13. March J.B. Weinstein D.B. Simple charring method for determination of lipids // J. Lipid Res. – 1966. – 7, №4. – P. 574–580.
14. Osawa Y., Uchinami H., Bielawski J., Schwabe R.F., Hannun Y.A., Brenner D. A. Roles for C16-ceramide and sphingosine 1-phosphate in regulating hepatocyte apoptosis in response to tumor necrosis factor β // J. Biol. Chem. – 2005. – 280, №30. – P. 27879–27887.
15. Siskind L.J., Colombini M. The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis // J. Biol. Chem. – 2000. – 275, № 49. – P. 38640–38644.
16. Zhang D. X., Fu-Xian Yi, Ai-Ping Zou, Pin-Lan Li Role of ceramide in TNF- β -induced impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in coronary arteries // Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2002. – 283. – P. H1785–H1794.

Харків. нац. ун-т ім. В.Н. Каразіна МОН України

*Матеріал надійшов до
редакції 13.01.2011*