

Міністерство освіти і науки України  
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Стороженко Галина Валеріївна**

УДК 577.125:612.66

**ДИСЕРТАЦІЯ**

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

03.00.13 – «Фізіологія людини та тварин»

(Біологічні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_Г. В. Стороженко

Науковий керівник Бабенко Наталія Олексіївна, доктор біологічних наук, професор

Харків – 2019

## 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 (Біологічні науки). – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2019.

При виконанні дисертаційної роботи використовували щурів 3-, 12-, 24- та 30-32-місячного віку. Наведено результати дослідження особливостей вмісту кардіоліпіну та ролі сфінголіпідів у порушенні обміну цього ліпиду в функціонально різних тканинах і органах щурів. Крім того у дисертаційній роботі встановлений взаємозв'язок між вмістом кардіоліпіну, цераміду і функціональним станом тканин щурів лінії Вістар.

На першому етапі цього дослідження було вивчено як змінюється рівень мітохондріального фосфоліпиду кардіоліпіну у процесі старіння в серці, печінці та мозку щурів. В роботі встановлено, що у процесі онтогенезу в досліджених тканинах щурів спостерігається зниження рівня кардіоліпіну, що досягає найбільш глибоких змін у клітинах 30-32 місячних щурів.

Попередніми дослідженнями було встановлено, що церамід прогресуюче зростає в мозку, серці і печінці при старінні. З огляду на його здатність впливати на мітохондрії наступним етапом нашої роботи явилось дослідження взаємозв'язку між накопиченням цераміду і вмістом кардіоліпіну. З цією метою використовувались різні моделі, що призводять до зростання ендогенних церамідів у клітинах і тканинах молодих тварин. Введення молодим щурам доксорубіцину або додавання цього препарату до середовища інкубації гепатоцитів призводило до зниження вмісту кардіоліпіну в серці та клітинах печінки 3-місячних щурів у порівнянні з контрольними щурами або клітинами. Для з'ясування, що спостережуване

зниження кардіоліпіну було викликане саме накопиченням кераміду, в роботі використовували модулятори метаболізму кераміду в клітинах – іміпрамін, GW4869 або міріюцин. Встановлено, що пригнічення шляхів синтезу кераміду *de novo* міріюцином призводило до нормалізації вмісту кардіоліпіну та фосфатидної кислоти в гепатоцитах 3-місячних щурів.

Відомо, що крім протипухлинних препаратів потужними модуляторами метаболізму сфінголіпідів є насичені жири харчового раціону або етанол, які призводять до накопичення кераміду в тканинах. В роботі встановлено, що збагачення ліпідного компонента дієти насиченими жирними кислотами яловичого жиру призводило до зниження вмісту кардіоліпіну і накопичення фосфатидної кислоти в досліджених тканинах порівняно з такими в щурів, які отримували стандартний раціон. У той же час, обмеження калорійності харчового раціону, яке запобігає підвищенню вмісту кераміду в клітинах при старінні, у свою чергу перешкоджало зниженню рівня кардіоліпіну в серці, печінці та мозку 24-місячних щурів. Крім того, внутрішньошлункове введення 3-місячним щурам етанолу призводило до зниження вмісту кардіоліпіну, а використання n-3 поліненасичених жирних кислот риб'ячого жиру або кверцетину – препаратів, які попереджають накопичення керамідів, запобігало зниженню вмісту кардіоліпіну в серці і печінці щурів, які отримували етанол.

Для доказу ролі кераміду в модуляції обміну і вмісту кардіоліпіну використовували екзогенні натуральні і синтетичні кераміди в модельних експериментах на ізольованих клітинах. Для цього використовували синтетичний коротколанцюговий C2-церамід та природні довголанцюгові: C16- і C18-цераміди. Встановлено, що інкубація гепатоцитів з екзогенними керамідами викликала зниження рівня кардіоліпіну в клітинах печінки молодих щурів. При цьому зниження рівня кардіоліпіну супроводжувалося зниженням життєздатності гепатоцитів і передувало вивільненню вільних жирних кислот, диацилгліцеролів, триацилгліцеролів і фосфоліпідів в середовище культивування клітин. В той же час, додавання C2-цераміду до

середовища інкубації гепатоцитів 3-місячних щурів приводило до зниження рівня кардіоліпіну і зменшення включення  $[^{14}\text{C}]$ лінолевої кислоти у його склад та збільшення попередника у синтезі фосфоліпідів – фосфатидної кислоти. Отримані дані, свідчать про те, що збільшення в клітинах вмісту цераміду викликає зниження рівня кардіоліпіну, пригнічуючи ремоделювання цього фосфоліпиду, що в подальшому може призводити до загибелі клітин і розвитку патологій печінки. В той же час, перфузія серця молодих щурів C16-церамідом призводила до зниження вмісту кардіоліпіну в м'язовій тканині серця, що дозволило виявити взаємозв'язок між вмістом цераміду та кардіоліпіну в серці щурів.

Відомо, що з віком в корі і гіпокампі щурів спостерігається істотне збільшення вмісту цераміду. З метою з'ясування ролі накопичення ендогенних церамідів мозку у вікових змінах вмісту кардіоліпіну та функціонального стану мозку вивчали вплив екзогенного C16-цераміду на вміст кардіоліпіну в корі і гіпокампі 3-місячних щурів, а також на особливості поведінки цих тварин. Для цього в наступній серії експериментів молодим 3-місячним щурам вводили C16-церамід шляхом інтраназального вприскування, що призводило до збільшення рівня цераміду та зменшення вмісту кардіоліпіну в гіпокампі, та появи деяких особливостей в поведінці піддослідних щурів: зростання тривожності, пригнічення локомоторної та дослідницької активності, ослаблення інстинктів догляду за собою, що може свідчити про розвиток депресивно-подібного стану. Крім того, порівняння поведінки молодих (3-місячних) та старих (24-місячних) і дуже старих (30-32-місячних) щурів виявило зміни в поведінці щурів в пізньому онтогенезі, подібні до спостережуваних при введенні C16-цераміду 3-місячним тваринам. Отримані результати підкреслюють взаємозв'язок між накопиченням цераміду, зменшенням кардіоліпіну та розвитком депресивно-подібних станів. Вважається що при старінні основна маса цераміду в клітинах утворюється в результаті надмірної активації кислої та нейтральної сфінгомелінази. Разом із цим, відомо, що N-ацетилцистеїн широко

використовуваний *in vivo* та *in vitro* антиоксидант, в той же час є інгібітором нейтральної сфінгомієлінази. Введення старим щурам N-ацетилцистеїну – препарату, що зменшує рівень цераміду шляхом пригнічення нейтральної сфінгомієлінази, призводило до відновлення рівня кардіоліпіну та зникненню ознак депресивно-подібної поведінки. Так, в 24-місячних щурів, яким вводили N-ацетилцистеїн зростала перевага до солодкого розчину, збільшувалася дослідницька активність і тривалість грумінгових реакцій та зменшувалась тривожність порівняно з групою контрольних старих тварин.

Раніше було встановлено, що інгібітори кислої сфінгомієлінази іміпрамін і золедронова кислота або інгібітор нейтральної сфінгомієлінази N-ацетилцистеїн ефективно знижують вміст цераміду та співвідношення церамід/сфінгомієлін і збільшують вміст сфінгомієліну в тканинах старих щурів. В нашій роботі введення старим тваринам іміпраміну або золедронової кислоти призводило до збільшення рівня кардіоліпіну в серці та печінці 24-місячних щурів. Отримані дані свідчать про те, що накопичення цераміду, викликане активацією сфінгомієліназ є важливою причиною зниження вмісту кардіоліпіну в вивчених тканинах в старості.

Для з'ясування чи впливають вікові зміни вмісту кардіоліпіну, індуковані накопиченням цераміду на зміни фізіологічного стану клітин досліджували вплив екзогенного кардіоліпіну на здатність клітин-мішеней адекватно відповідати на дію інсуліну. Встановлено, що внесення екзогенного кардіоліпіну до середовища інкубації клітин печінки, кори мозку або литкового м'язу 24-місячних щурів збільшує базальне поглинання ними глюкози і синтез глікогену та підвищує чутливість цих клітин до дії інсуліну. У модельних експериментах на ізольованих клітинах печінки встановлено, що додавання екзогенного кардіоліпіну до середовища інкубації гепатоцитів 3-місячних щурів після індукції накопичення цераміду доксорубіцином або C16-церамідом призводить до зростання базального та інсулін-стимульованого поглинання глюкози та синтезу глікогену. Таким чином, отримані дані свідчать про те, що вікове зниження вмісту кардіоліпіну в

класичних тканинах-мішенях і мозку може грати важливу роль в зниженні їх чутливості до дії інсуліну.

Таким чином, в даній роботі виявлено взаємозв'язок між накопиченням церамиду у старості та зниженням рівня кардіоліпіну в серці, печінці та мозку щурів. Встановлена залежність функціонального стану клітин і тканин, та поведінки щурів від вмісту кардіоліпіну. Продемонстровані в даній роботі можливості корекції метаболізму кардіоліпіну за допомогою аліментарних факторів або модуляторів обміну сфінголіпідів можуть являти собою основу для пошуку нових лікарських препаратів і сприяти підвищенню ефективності комплексної терапії вік-асоційованих захворювань.

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

## 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 (Biology). – V. N. Karazin Kharkiv National University, the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2019.

Through the thesis research, rats of 3-, 12-, 24- and 30-32-months age were used. The results of the investigation provided here describe the distinctive features of cardiolipin content in functionally different tissues and organs of rats and role of sphingolipids in cardiolipin metabolism dysfunction. Furthermore, in frames of this dissertation the interrelations between cardiolipin and ceramide levels were investigated due to their participation in functional state of the Wistar line rats' tissues.

At the first stage of the study, it was investigated how the level of mitochondrial phospholipid cardiolipin changes during the aging process in the heart, liver and brain of rats. It was determined that through ontogenesis in the

studied rats` tissues a decrease in the cardiolipin level occurs, where the most significant changes were found in the cells of 30-32-months-old rats.

Previous studies declared that ceramides levels are progressively increasing in brain, heart and liver during aging. In view of ceramide is able to influence mitochondria, the next stage of our work included studying relationship between the ceramide accumulation and cardiolipin content. Various models for endogenous ceramides level elevation in cells and tissues of young animals have been used. Doxorubicin administration in young rats resulted in a cardiolipin content decrease in heart and addition of this drug to the hepatocytes incubation media resulted in a cardiolipin content decrease in liver cells of 3-month-old rats compared to control rats or cells. To determine if the observed cardiolipin reduction was referred to the ceramide accumulation, the modulators of ceramide cell metabolism – imipramine, GW4869 or myriocin – were used. It was found that inhibition of the ceramide *de novo* synthesis pathways by myriocin resulted in cardiolipin and phosphatidic acid content normalization in hepatocytes of 3-month-old rats.

It is known that as well as antitumor drugs, saturated dietary fats and ethanol are powerful sphingolipid metabolism modulators, and provoke ceramide accumulation of in tissues. In our work, the enrichment of the diet lipid component with saturated fatty acids from beef fat led to a decrease in cardiolipin 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 ceramide content increase in aging cells, in turn, prevented cardiolipin levels reduction in heart, liver and brain of 24-month-old rats. In addition, intragastric ethanol administration to 3-month-old rats resulted in cardiolipin content decrease and fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids or quercetin administration known to prevent ceramides accumulation prevented as well cardiolipin content reduction in heart and liver of ethanol-fed rats.

To prove the ceramide role in cardiolipin exchange and content modulation, exogenous natural and synthetic ceramides were used in model experiments in

isolated cells. Thus, synthetic short-chain C2-ceramides and natural long chain C16- and C18-ceramides were used. It was determined that hepatocytes incubation with exogenous ceramides caused cardiolipin level decrease in liver cells of 3-month-old rats. At the same time, cardiolipin level decrease was accompanied by hepatocytes viability drop and free fatty acids, diacylglycerols, triacylglycerol's and phospholipids release in the culture medium. At the same time, C2-ceramide addition to hepatocyte incubation medium in 3-month-old rats' cells led both to cardiolipin level decrease and a drop in isotope-labeled linoleic acid inclusion to newly synthesized cardiolipin as well as increase in content of phosphatidic acid, which is phospholipid synthesis precursor. The obtained data indicate that ceramide content increase in the cell causes cardiolipin level decrease, via cardiolipin 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 cardiolipin content decrease in heart muscle tissue, thus the relationship between the ceramide and cardiolipin content was revealed in the rat's heart.

Significant increase in ceramide content in cortex and hippocampus of old animals is well known. In order to reveal the role of endogenous brain ceramides in cardiolipin content age-related changes and brain functional state, the exogenous C16-ceramide effect on cardiolipin 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 ceramide level increase and cardiolipin 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. Additionally, behavior comparison of young (3-month) and old (24-month) and very old (30-32-month) rats revealed behavioral changes in rats in late ontogenesis, similar to those observed with C16-ceramide administered to 3-month-old animals. The obtained results emphasize relationship between ceramide accumulation, cardiolipin reduction and



depressive-like states development. Ceramide accumulation in the aged cells and tissues is accompanied by increased acid sphingomyelinase and neutral sphingomyelinase activities. At the same time, it is known that N-acetylcysteine is a widely used *in vivo* and *in vitro* antioxidant, while being an inhibitor of neutral sphingomyelinase. In the work, N-acetylcysteine (drug that reduces ceramide level by inhibiting neutral sphingomyelinase) administration in old rats led to cardiolipin level recovery and depressive-like behavior signs disappearance. Thus, in 24-month-old rats administered N-acetylcysteine, the preference for a sucrose solution increased, research activity and duration of grooming reactions increased, and anxiety was decreased compared with the control group of old animals.

Previously it was found that acid sphingomyelinase inhibitors (imipramine and zoledronic acid), or neutral sphingomyelinase inhibitor (N-acetylcysteine), effectively reduce the ceramide amount and ceramide/sphingomyelin ratio and increase sphingomyelin content in old rat's tissues. In the work, imipramine or zoledronic acid administration in old animals resulted in cardiolipin level increase in heart and liver of 24-month-old rats. The data obtained indicate that the accumulation of ceramide caused by the activation of sphingomyelinases is an important reason for the cardiolipin content reduction in old age.

To determine how the age-related changes in cardiolipin content influence on the physiological state of cells, the effects of exogenous cardiolipin on target cells ability to respond adequately to insulin signal were studied. It was determined that exogenous cardiolipin 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 cardiolipin addition to hepatocytes incubation medium in 3-month-old rats after doxorubicin or C16-ceramide ceramide accumulation induction leads to an increase in basal and insulin-stimulated glucose uptake and glycogen synthesis. Thus, the obtained data suggest that age-related cardiolipin content changes may

play an important role in reducing insulin sensitivity in classical target tissues and in brain.

Therefore, in this work was revealed the relationship between ceramide accumulation and cardiolipin level decrease in heart, liver and brain of rats in old age. Cells and tissues functional state as well as rat's behavior were determined to depend on cardiolipin content. The possibilities of cardiolipin metabolism correction by alimentary factors or sphingolipid metabolism modulators demonstrated here can become a basis for the search of new drugs and can contribute to the complex therapy efficiency increase for age-associated diseases.

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

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

*Статті у виданнях, що входять до переліку фахових видань України*

1. **Стороженко ГВ**, Бабенко НА. Влияние пальмитиновой кислоты на содержание кардиолипина и фосфатидной кислоты в изолированных гепатоцитах крыс. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія. 2010;11(905):32-36.

2. Гарькавенко ВВ, **Стороженко ГВ**, Краснікова ОМ, Бабенко НО. Корекція вікових порушень вмісту сфінголіпідів у тканинах щурів за допомогою інгібування кислої сфінгомієлінази. Фізіологічний журнал. 2012;58(1):56-60. (Garkavenko VV, **Storozhenko GV**, Krasnikova ON, Babenko NA. Correction of age-related disorders of sphingolipid content in rat tissues by acid sphingomyelinase inhibition. IJPP [Internet]. 2012 [cited 2017 May 20];3(3). Available from: <http://www.dl.begellhouse.com/journals/6ec4ba27650016b1,58a23fd36bf60e8b,4b0d605c3f0ab8cf.html>) (Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні фізіологічних та біохімічних досліджень, здійснював статистичний аналіз одержаних даних).

*Статті у виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз*

3. Бабенко НО, **Стороженко ГВ**. Тривале обмеження калорійності харчового раціону попереджає вікові зміни вмісту біологічноактивних сфінго- та гліцероліпідів у тканинах щурів. Фізіол. журн. 2016;62(2):103-109. (Babenko NA, Storozhenko GV. Long-term food restriction prevents the age-related changes of the content of biologically active sphingo- and glycerolipids contents in the rat tissues. Fiziolohichnyi Zhurnal [Internet]. 2016 [cited 2017 July 1];62(2):103–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29537233> (SCOPUS))

4. Babenko NA, Garkavenko VV, **Storozhenko GV**, Timofiychuk OA. Role of acid sphingomyelinase in the age-dependent dysregulation of sphingolipids turnover in the tissues of rats. Gen. Physiol. Biophys. 2016 Apr;35(2):195–205. (SCOPUS, PubMed) *(Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні фізіологічних та біохімічних досліджень, здійснював статистичний аналіз одержаних даних).*

5. Бабенко НА, Стороженко ГВ. Роль церамида в снижении содержания кардиолипина в сердце старых крыс. Успехи геронтологии. 2017;30(1):43-48. (Babenko NA, **Storozhenko GV**. Role of ceramide in reduction of the cardiolipin content in the heart during aging. Adv Gerontol [Internet]. 2017 July [cited 2017 Sept 16];7(3):195-200.) (SCOPUS, PubMed) Available from: <https://link.springer.com/article/10.1134/S207905701703002X>

*Тези науково-практичних конференцій різного рівня*

6. **Стороженко ГВ**. Влияние флавоноида кверцетина на содержание фосфолипидов и кардиолипина в функционально различных тканях крыс. В: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. Матеріали VI наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Валеологія: сучасний стан, напрямки та перспективи розвитку»; 2008 квітня 3-5; Харків. Харків, 2008. Т. 1. с. 215-219.

7. **Стороженко ГВ**, Куликова ВС. Влияние высококалорийной диеты и кверцетина на содержание липидов в печени молодых крыс и ответ ткани на действие инсулина. В: ДУ «Інститут проблем ендокринної патології імені В.Я. Данилевського НАМН України». Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Фундаментальна та клінічна ендокринологія: проблеми, здобутки, перспективи» (Сьомі Данилевські читання); 2008 Лют. 21-22; Харків. Харків; 2008. с. 129-131. *(Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні фізіологічних досліджень та здійснював статистичний аналіз отриманих даних).*

8. **Стороженко ГВ.** Возрастные особенности содержания кардиолипина и фосфатидной кислоты в различных органах крыс линии Вистар. В: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Науково-дослідний інститут біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Матеріали VIII міжнар. симп. «Биологические механизмы старения»; 2008 травня 21-24; Харків. Харків, 2008. с. 48.

9. **Стороженко ГВ.** Возрастная динамика содержания кардиолипина и фосфатидной кислоты в печени и сердце крыс самцов линии Вистар. В: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. Матеріали III міжнар. конф. молодих науковців «Біологія від молекули до біосфери»; 2008 листопада 18-21; Харків. Харків, 2008. с. 156-157.

10. **Стороженко ГВ.** Модулирующее влияние кверцетина на содержание липидов в различных органах крыс при действии этанола. В: Матеріали Всеукраїнської конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології»; 2008 жовтня 30-31; Дніпропетровськ. 2008. с. 112.

11. **Стороженко ГВ.** Изменение содержания кардиолипина и общих фосфолипидов в печени и сердце крыс при действии этанола и его коррекция рыбьим жиром. В: Матеріали міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології»; 2009 лютого 23-26; Донецьк. 2009. с. 67-68.

12. **Storozhenko G.** Effect of the c2-ceramide on the cardiolipin content in rat hepatocytes. In: Materials of IV International Young Scientists conference «Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution»; 2009 september 16-19; Odessa. 2009. p. 181.

13. **Storozhenko G.** Cardiolipin content in Wistar rat's hepatocytes under exposure to C-2 ceramide. В: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. Матеріали IV міжнародної конференції молодих науковців

«Біологія від молекули до біосфери»; 2009 листопада 17-21; Харків. 2009. с. 64.

14. **Стороженко ГВ.** Вплив екзогенного С2-цераміда на вміст кардіоліпіна та загальних фосфоліпідів у гепатоцитах тримісячних щурів. В: Фізіол. журнал. Матеріали XVIII з'їзду Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю; 2010 травня 20-22; Одеса. Одеса; 2010. Т. 56(2). с. 199.

15. **Стороженко ГВ.** Изучение влияния пальмитиновой кислоты на содержание кардиолипина в изолированных гепатоцитах старых крыс. В: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Науково-дослідний інститут біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Матеріали IX міжнар. симп. «Биологические механизмы старения»; 2010 травня 26-29; Харків. Харків, 2010. с. 25-26.

16. **Стороженко ГВ.** Избыток насыщенных жиров в диете молодых крыс вызывает изменения липидного спектра, характерные для старения. В: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Науково-дослідний інститут біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Матеріали X міжнар. симп. «Биологические механизмы старения»; 2012 травня 16-19; Харків. Харків, 2012. с. 55.

17. **Стороженко ГВ, Харченко ВС, Бабенко НА.** Церамид и фосфолипаза Д-зависимый сигналинг инсулина. В: ДУ «Інститут проблем ендокринної патології імені В.Я. Данилевського НАМН України». Матеріали наук.-практ. конференції «Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології» (Дванадцяті Данилевські читання); 2013 Бер. 14-15; Харків. Харків; 2013. с. 130-1. *(Здобувач брав участь у плануванні експерименту проводив фізіологічні дослідження та аналізував отримані результати).*

18. **Стороженко ГВ.** Влияние модуляторов обмена сфинголипидов на содержание кардиолипина в различных тканях крыс. В: Материалах

I Международной научно-практической интернет-конференции «Липидология – наука XXI века»; 2013 ноября 26; Казань. 2013. с. 188-189.

19. **Стороженко ГВ.** Влияние витамина Е и n-ацетилцистеина на содержание кардиолипина в различных тканях старых крыс. В: Фізіол. журн. (Додаток). Матеріали ХІХ-го з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнар. участю; 2014; Київ. Київ; 2014. Т. 60(3). с. 187.

20. **Стороженко ГВ, Гарькавенко ВВ.** Модуляция вызванных доксорубицином изменений липидного обмена клеток печени ингибиторами сфингомиелиназной активности В: Укр. біохім. журнал. Матеріали ХІ Українського біохімічного конгресу; 2014 Жовт. 6-10; Київ. Київ; 2014. Т. 86(5, supplement 1). с. 208. *(Здобувач брав участь у проведенні експерименту та обговоренні результатів досліджень, оформлював одержані дані у вигляді тез доповіді)*

21. **Стороженко ГВ.** Ефекти екзогенного кардіоліпіну на функціональний стан клітин та тканин старих щурів. В: Матеріали ІV міжнародної науково-практичної конференції «Теорія і практика актуальних наукових досліджень»; 2017 жовтня 27-28; Львів. 2017. с. 61-63.

*Статті, що додатково відображають зміст дисертації*

22. **Бабенко НА, Стороженко ГВ, Гарькавенко ВВ.** Роль N-ацетил-d-эритро-сфингозина в нарушении обмена липидов и жизнеспособности клеток печени. Экспериментальная і клінічна медицина. 2011;1(50):27-32. *(Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні фізіологічних та біохімічних досліджень, здійснював статистичний аналіз одержаних даних).*

23. **Стороженко Г.В.** Корекція індукованих етанолом порушень ліпідного профілю у тканинах щурів. Одеський медичний журнал. 2014;3(143):30-34.

24. **Бабенко НА. Стороженко ГВ.** Коррекция возрастного нарушения содержания кардиолипина в тканях крыс путем подавления активности

нейтральной сфингомиелиназы. Проблемы старения и долголетия. 2015;24(3-4):257-265.



## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	21
ВСТУП.....	22
РОЗДІЛ 1. РОЛЬ КАРДІОЛІПІНУ ТА СФІНГОЛІПІДІВ В СИГНАЛЬНОЇ ТРАНСДУКЦІЇ (літературний огляд).....	30
1. 1 Кардіоліпін. Роль в сигнальній трансдукції. Функціональне значення.....	30
1. 2 Особливості метаболізму кардіоліпіну у процесі онтогенезу і при різних патологічних станах.....	37
1. 3 Роль сфінголіпідів у порушенні функціонального стану клітин і тканин.....	43
Висновки до розділу 1.....	49
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	51
2. 1 Постановка експерименту.....	51
2. 2 Експерименти на тваринах.....	51
2. 2. 1 Утримання 3-місячних щурів на висококалорійному раціоні, збагаченому пальмітиною кислотою.....	51
2. 2. 2 Утримання щурів різного віку на калорійно-обмеженому раціоні.....	52
2. 2. 3 Дослідження поведінки щурів різного віку.....	53
2. 2. 3. 1 Тест «Відкрите поле».....	53
2. 2. 3. 2 Тест «Темний/світлий відсік».....	54
2. 2. 3. 3 Тест «Перевага до розчину сахарози».....	54
2. 2. 3. 4 Тест «Годування в незнайомій обстановці».....	55
2. 2. 3. 5 Тест «Імобілізація за хвіст».....	55
2. 2. 3. 6 Тест «Сплеш-тест».....	55
2. 2. 4 Інтраназальне введення D-еритро-N-пальмітоїлсфінгозину 3-місячним щурам.....	56

2. 2. 5 Інтраназальне введення N-ацетилцистеїну 24-місячним щурам.....	57
2. 2. 6 Внутрішньошлункове введення етанолу або риб'ячого жиру та кверцетину на тлі етанолу 3-місячним щурам.....	57
2. 2. 7 Внутрішньочеревне введення доксорубіцину 3-місячним щурам.....	59
2. 2. 8 Внутрішньом'язове введення іміпраміну та золедронової кислоти, або внутрішньошлункове введення N-ацетилцистеїну 24-місячним щурам.....	59
2. 3 Експерименти на тканинах.....	60
2. 3. 1 Дослідження вмісту кардіоліпіну у тканинах щурів різного віку.....	60
2. 3. 2. Дослідження ефекту екзогенного цераміду на вміст кардіоліпіну в тканинах мозку 3-місячних щурів.....	61
2. 3. 3 Дослідження ефекту екзогенного цераміду на вміст кардіоліпіну в тканинах серця 3-місячних щурів.....	61
2. 3. 4 Дослідження ефекту екзогенного кардіоліпіну на базальний та стимульований інсуліном транспорт глюкози і синтез глікогену в м'язах та мозку 3- та 24-місячних щурів...	62
2. 3. 5 Виділення мітохондрій з печінки, серця і мозку 3- та 24-місячних щурів.....	63
2. 4 Експерименти на клітинах.....	63
2. 4. 1 Дослідження впливу тривалості культивування та різних концентрацій екзогенних церамідів на вміст кардіоліпіну у гепатоцитах 3-місячних щурів.....	64
2. 4. 2 Дослідження впливу індукторів накопичення цераміду на вміст кардіоліпіну у гепатоцитах 3-місячних щурів.....	64
2. 4. 3 Дослідження одночасного впливу екзогенного кардіоліпіну та індукторів накопичення цераміду на	

базальний та стимульований інсуліном транспорт глюкози і синтез глікогену в гепатоцитах 3-місячних щурів.....	65
2. 4. 4 Вплив екзогенного кардіоліпіну на базальний та стимульований інсуліном транспорт глюкози та синтез глікогену в ізольованих гепатоцитах 3- та 24-місячних щурів.....	66
2. 5 Екстракція ліпідів печінки, серця, гіпокампу, неокортексу, ізольованих гепатоцитів та мітохондрій щурів різного віку .....	67
2. 6 Розподіл ліпідів на фракції за допомогою тонкошарової хроматографії.....	67
2. 7 Елюювання ліпідів.....	67
2. 8 Кількісне визначення ліпідів.....	68
2. 9 Визначення вмісту білка.....	69
2. 10 Визначення активності аланінамінотрансфераз, аспартатамінотрансфераз та лактатдегідрогеназ у сироватці крові	69
2. 11 Визначення сфінгомієліназної активності в ізольованих гепатоцитах щурів .....	69
2. 12 Вивчення синтезу кардіоліпіну в ізольованих гепатоцитах 3-місячних щурів .....	70
2. 13 Статистичний аналіз даних.....	70
2. 14 Список використаних реактивів.....	71
Висновки до розділу 2.....	72
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	73
3. 1 Вікові особливості вмісту кардіоліпіну в функціонально різних тканинах і органах щурів.....	73
3. 2 Роль керамідів у вікових змінах метаболізму кардіоліпіну в функціонально різних тканинах щурів 3- та 24-місячного віку	78
3. 2. 1 Вплив дієтичних факторів та фармакологічних препаратів, що індукують накопичення керамідів у	

клітинах на вміст кардіоліпіну в тканинах щурів різного віку .....	78
3. 2. 2 Модуляція метаболізму кардіоліпіну за допомогою екзогенних натуральних і синтетичних керамідів у серці, ізольованих гепатоцитах та мозку 3-місячних щурів .....	100
3. 2. 2. 1 Вплив екзогенних керамідів на вміст кардіоліпіну в клітинах печінці та серця 3-місячних щурів.....	100
3. 2. 2. 2 Вплив екзогенного С16-кераміду на вміст кардіоліпіну в гіпокампі і корі мозку та поведінку 3-місячних щурів.....	111
3. 3 Вплив інгібіторів обміну сфінголіпідів на вміст кардіоліпіну в тканинах і клітинах та поведінку 24-місячних щурів.....	120
3. 4 Вплив екзогенного кардіоліпіну на чутливість клітин 24-місячних щурів до інсуліну.....	129
Висновки до розділу 3.....	136
ВИСНОВКИ.....	139
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	142
ДОДАТОК 1 Список публікацій здобувача за темою дисертації.....	176
ДОДАТОК 2 Акт впровадження.....	182

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

C2-церамід	- N- ацетил-D-сфінгозин
C16-церамід	- N-пальмітоїл-D-сфінгозин
C18-церамід	- N-стеароїл-D-сфінгозин

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** З віком у клітинах і тканинах тварин відбуваються зміни метаболізму різних груп ліпідів. Одними з таких ліпідів є сфінголіпіди, вікові порушення метаболізму яких асоціюються з виникненням і розвитком цілого ряду патологічних станів: жирової дистрофії печінки, інсулін резистентності, різних нефропатій, атеросклерозу, синдрому Альцгеймера та інших захворювань [1, 2, 3, 4]. Крім того, сфінголіпіди є важливими структуроутворюючими ліпідами біологічних мембран, та попередниками активних метаболітів, які грають роль медіаторів клітинних сигналів у процесах проліферації, диференціації та росту клітин, запалення, онкогенезу і старіння [5, 6, 7]. Критична роль у регуляції клітинних процесів через сигнальний сфінгомієліновий шлях належить саме цераміду, який будучи вторинним месенджером, модулює фосфорилування різних білків і є індуктором апоптозу [5, 6, 7, 8]. Відомо, що рівень цераміду в клітинах істотно зростає в умовах природного старіння організму [9, 10, 11]. Так, в нашій лабораторії показано накопичення цераміду і підвищення співвідношення церамід/сфінгомієлін в клітинах старіючого організму [12, 13]. Однак механізми, якими накопичення цераміду призводить до розвитку патологій залишаються недостатньо вивченими [14, 15]. Разом з цим, останнім часом велике значення надається проблемам мітохондріальної дисфункції, як можливої причини виникнення і розвитку ряду серцево-судинних і нейродегенеративних захворювань [16, 17, 18] і передбачається, що церамід може безпосередньо впливати на мітохондрії [19, 20, 21]. Так, загибель клітин при ішемії/реперфузії, при дії фактору некрозу пухлини альфа (TNF- $\alpha$ ), Fas-ліганда, етопозиду, ультрафіолетового або іонізуючого випромінювання асоціюють зі збільшенням мітохондріального цераміду [22, 23]. Показано також, що селективний гідроліз мітохондріального пулу сфінгомієліну з утворенням цераміду при дії бактеріальної сфінгомієлінази на мітохондрії призводить до

апоптозу [24, 25, 26]. Ці роботи підкреслюють фізіологічне значення мітохондріальних пулів цераміду і сфінгомієліну. Функціонально цераміди пригнічують дихальну активність респіраторного ланцюга, і регулюють проникність зовнішньої мембрани мітохондрій і мітохондріальної пори для цитохрому с, діючи самотійно або разом з білком Вах [27]. Але питання про шляхи, якими накопичення цераміду може призводити до порушення роботи мітохондрій лишається відкритим. Таким чином, вивчення прямого і опосередкованого впливу цераміду на мітохондрії є ключем у розумінні процесів, що відбуваються в клітинах при порушенні метаболізму і розвитку патологічних станів.

Відомо, що кардіоліпін – специфічний ліпід мітохондрій, який відіграє важливу роль у функціонуванні дихального ланцюга в клітинах, зв'язуючи цитохром С, 3 і 4 комплекси респіраторного ланцюга [28, 29]. Показано, що зниження інтенсивності електрон-транспортного ланцюга мітохондрій, як правило, пов'язане зі зменшенням вмісту кардіоліпіну [30, 31]. Так, падіння рівня цього фосфоліпиду спостерігається при ішемії/реперфузії, гіпотиреозі, окисному стресі, серцевої недостатності [32, 33, 34, 35, 36, 37] і може бути однією з ключових причин входження клітини в апоптоз, в той час як підтримка нормального рівня кардіоліпіну надає антиапоптогенні ефекти [38, 39, 40]. В той же час встановлено, що кардіоліпін, який в нормі розташований у внутрішній мембрані мітохондрій, при пошкодженні цих органел екстерналізується в зовнішній шар мембрани мітохондрій та слугує сигналом до запуску мітофагії [41, 42, 43, 44, 45]. Крім того, рядом робіт продемонстроване, що рівень кардіоліпіну знижується при старінні, але в щурів різних ліній цей процес спостерігається у різному віці [30, 46].

У зв'язку з віковим накопиченням в тканинах проапоптотичного месенджера – цераміду, 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 [47] та поліненасичених

жирних кислот [48] призводить до нормалізації рівня цераміду в умовах вікового та експериментального порушення його вмісту, а також відновлює чутливість клітин до дії гормонів [49] і сприяє поліпшенню знижених з віком когнітивних функцій [50, 51].

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

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

- дослідити вікові особливості вмісту кардіоліпіну в мозку і периферичних тканинах щурів;
- дослідити ефекти різних препаратів, що індукують накопичення ендогенних церамідів, на рівень кардіоліпіну в клітинах і тканинах щурів;
- вивчити вплив природних і синтетичних екзогенних церамідів на метаболізм кардіоліпіну в клітинах і тканинах молодих щурів;
- дослідити ефекти С16-цераміду на поведінку та вміст кардіоліпіну в гіпокампі і корі головного мозку 3-місячних щурів;
- вивчити можливості корекції вікових і експериментальних порушень метаболізму кардіоліпіну в клітинах і тканинах тварин різного віку;
- дослідити ефекти інгібіторів сфінгомієліназ і синтезу цераміду на поведінку та вміст кардіоліпіну в гіпокампі і корі головного мозку та інших органах та тканинах 24-місячних щурів;



– дослідити ефекти екзогенного кардіоліпіну на функціональний стан клітин і тканин старих щурів.

- *об'єкт дослідження* – корекція вікових та експериментальних порушень метаболізму кардіоліпіну за допомогою модуляторів вмісту цераміду в різних тканинах щурів.

- *предмет дослідження* – вміст і обмін кардіоліпіну в клітинах печінки, серця, гіпокампу і неокортексу щурів у процесі онтогенезу, або при експериментальному змінненні вмісту цераміду. Крім того, предметом дослідження є поведінка щурів при віковому або експериментальному порушенні метаболізму кардіоліпіну та цераміду.

**Методи дослідження.** Дослідження впливу C16-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  $^{14}\text{C}$ -мічених попередників до складу ендогенних ліпідів. Визначення вмісту кардіоліпіну 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: параметричні (t-критерій Стюдента - при порівнянні двох груп і дисперсійний аналіз, - з метою множинних порівнянь), і непараметричні (критерії Манна-Уїтні, Крускала-Уолліса, Фрідмана і Уїлкоксона).

**Наукова новизна отриманих результатів.** У дисертаційній роботі встановлено значне зниження рівня мітохондріального фосфоліпіду кардіоліпіну в серці, печінці та мозку 30-32-місячних щурів лінії Вістар.

Отримані в даній роботі результати припускають щільний взаємозв'язок метаболізму сфінголіпідів і кардіоліпіну. Так, індукція накопичення ендогенних церамідів і вплив на клітини і тканини, екзогенних церамідів різної природи призводить до зменшення рівня кардіоліпіну і зниження життєздатності клітин. У той час як, інгібітор синтезу цераміду – міріоцин дозволяє знизити індуковану доксорубіцином генерацію церамідів і нормалізувати вміст кардіоліпіну в клітинах молодих щурів. А порушення обміну сфінго- і гліцероліпідів, що викликані етанолом, вдається коригувати додаванням до харчового раціону кверцетину або поліненасичених жирних кислот риб'ячого жиру на тлі дії етанолу. Крім того, модуляція обміну сфінголіпідів калорійним обмеженням раціону або дією інгібіторів різних ферментів, які каталізують утворення цераміду, дозволяють нормалізувати знижений рівень кардіоліпіну в клітинах і тканинах старих тварин.

Показано також, що збільшення вмісту цераміду в мозку молодих тварин за допомогою введення C16-цераміду призводить до зниження рівня кардіоліпіну в гіпокампі та сприяє появі депресивно-подібних особливостей поведінки: ангедонії, зменшенню частоти грумінгу та реакцій догляду за собою, зростанню тривожності. Вікове зниження рівня кардіоліпіну 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 цераміду, також спостерігалось підвищення вмісту кардіоліпіну в мозку, а депресивно-подібні ознаки поведінки зникали.

Крім того, встановлено що додавання екзогенного кардіоліпіну 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 C16-цераміду та

кардіоліпіну на гепатоцити 3-місячних щурів викликала відновлення функціонального стану клітин, зростання базального та інсулін-стимульованого поглинання глюкози і синтезу глікогену.

**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 симпозіумах «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: Ліпидологія – 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).

**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.

**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).

**Практичне значення отриманих результатів.** Отриманні в роботі данні про особливості метаболізму кардіоліпіну в клітинах і тканинах щурів з віком та його взаємозв’язку з накопиченням цераміду в цих умовах сприяють розширенню уявлення про можливі причини розвитку патологічних станів,

асоційованих з дисфункцією мітохондрій та можуть бути перспективними для пошуку нових шляхів у подоланні вікових патологій. Крім того, отримані дані дозволяють припустити щільний зв'язок між рівнем кардіоліпіну та появою депресивно-подібних ознак поведінки щурів. Продемонстровані в даній роботі можливості корекції метаболізму кардіоліпіну за допомогою аліментарних факторів або модуляторів обміну сфінголіпідів 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).

## РОЗДІЛ 1

### РОЛЬ КАРДІОЛІПІНУ ТА СФІНГОЛІПІДІВ В СИГНАЛЬНОЇ ТРАНСДУКЦІЇ

(літературний огляд)

#### 1.1 Кардіоліпін. Роль в сигнальній трансдукції. Функціональне значення

В 1941 році Мері Пенгборн, досліджуючи ліпіди серцевого м'яза бика, відкрила новий фосфоліпід, який отримав назву кардіоліпін. Протягом років вивчення цього ліпіду було встановлено, що кардіоліпін є важливим фосфоліпідом який приймає участь у багатьох клітинних процесах.

Сучасні уявлення про роль кардіоліпіну передбачають, що цей ліпід є необхідним для окисного фосфорилування та приймає участь у процесах апоптозу і функціонуванні мітохондрій. Кардіоліпін сприяє організації білків у високо впорядковані комплекси, які у свою чергу підвищують ефективність генерації активних форм кисню при окисному фосфорилуванні.

Унікальність кардіоліпіну полягає в тому, що він є фосфоліпідом, який локалізований виключно на внутрішній поверхні мітохондріальних мембран, де кардіоліпін складає більш ніж 20 % від усіх мембранних ліпідів. У зв'язку з чим, зниження вмісту кардіоліпіну в мембранах мітохондрій при різних стресових станах (температурний шок, окислювальний стрес і інше), в сучасних роботах розглядається як критичний чинник для функціонування цих органел [52]. М'язова тканина серця, у порівнянні з іншими органами, найбільш багата на кардіоліпін, тому порушення метаболізму цього ліпіду в першу чергу пов'язують з розвитком різних серцевих патологій: інфарктів міокарду, інсультів та серцевої недостатності [53].

Крім того, дефіцит кардіоліпіну в даний час асоціюється з низкою патологічних станів, включаючи синдром Барта, хворобу Паркінсона, чоловіче безпліддя і багато інших захворювань, які супроводжуються порушенням функціонального стану мітохондрій. Синдром Барта є спадковим захворюванням, який характеризується скелетної міопатією, кардіоміопатією, нейтропенією і затримкою росту. В даний час, передбачається, що клінічні прояви цього синдрому пов'язані з дефектом метаболізму кардіоліпіну і порушеннями функціонування респіраторного ланцюга мітохондрій [54, 55, 56].

За хімічною будовою кардіоліпін є фосфоліпідом, який складається з двох диефірних фосфатних груп, з'єднаних, молекулою гліцерину (Рис. 1.1). У складі кардіоліпіну виявлено як насичені, так і ненасичені жирні кислоти.

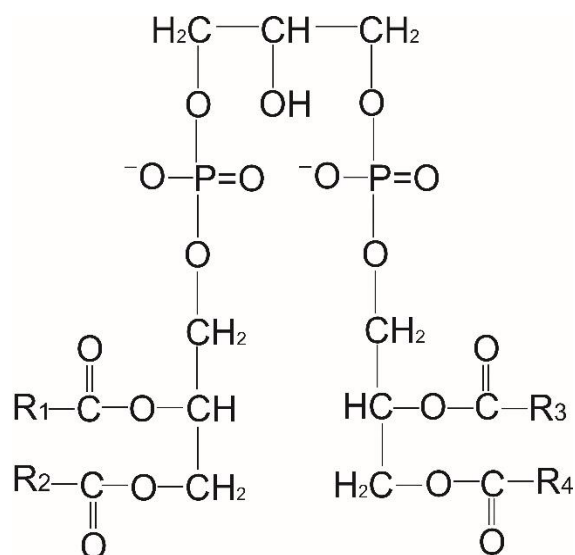


Рис. 1.1 Хімічна будова кардіоліпіну

Біосинтез кардіоліпіну починається з фосфатидної кислоти, яка за допомогою CDP-диацилгліцеролсинтази перетворюється в CDP-диацилгліцерол і пірофосфат (Рис. 1.2). Після цього фосфатидилгліцерофосфатсинтаза каталізує створення фосфатидилгліцерофосфату із CDP-диацилгліцеролу та sn-гліцерол-3-фосфату. Потім фосфатидилгліцерофосфат дефосфорилується у фосфатидилгліцерол за допомогою фосфатидилгліцерофосфатази. І, нарешті, кардіоліпінсинтаза каталізує

конденсацію CDP-діацилгліцеролу і фосфатидилгліцеролу з утворенням кардіоліпіну (Рис. 1.2).

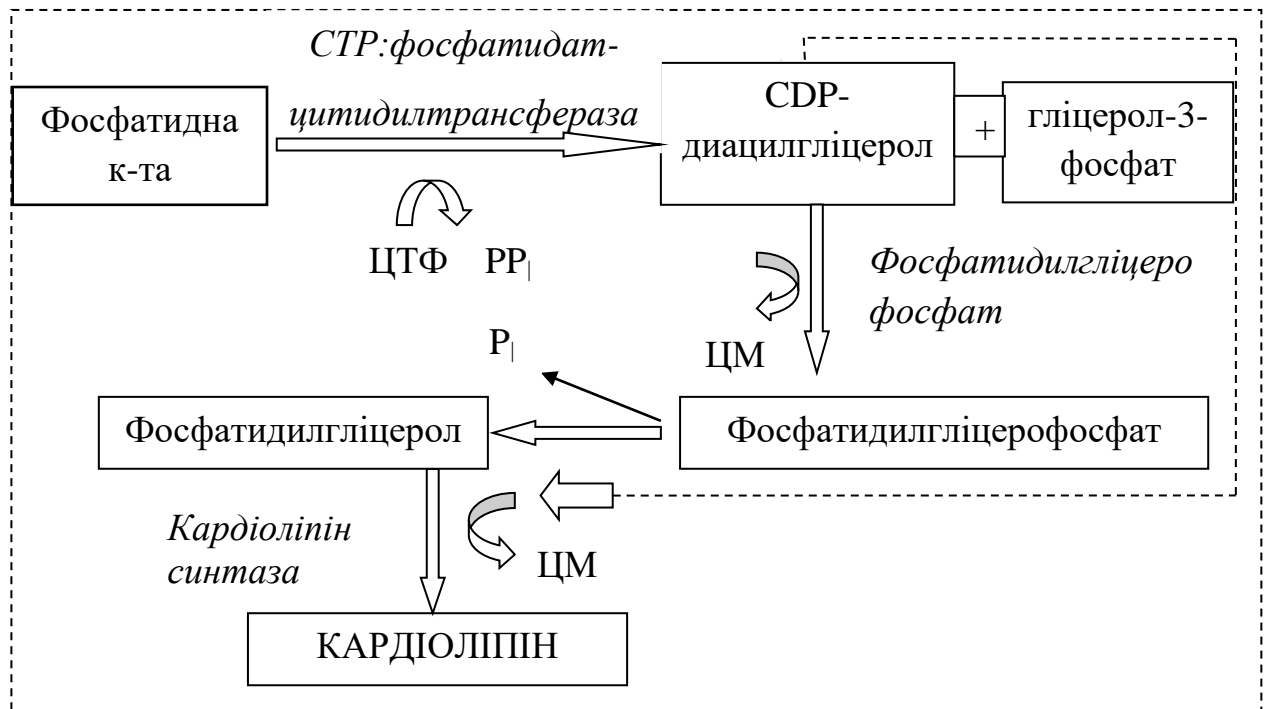


Рис. 1.2 Біосинтез кардіоліпіну *de novo*

Відомо, що жирнокислотний склад молекули кардіоліпіну має важливе значення для нормального функціонування цього ліпиду [57]. Молекулярні види кардіоліпіну залежать від його жирнокислотної композиції та сильно варіюють в залежності від типу клітин та їх метаболічної активності [28]. У склад кардіоліпіну переважно входять лінолева і олеїнова кислоти. Найбільший вміст кардіоліпіну спостерігається в тканині серця, де цей ліпід складає не менш 20 % від усіх мітохондріальних фосфоліпідів [58]. В печінці вміст кардіоліпіну складає приблизно 10-15 % від загальних фосфоліпідів [59, 60, 61]. Показане, що в серці і печінці жирнокислотний склад представлений в основному лінолевою кислотою, яка становить до 80-90 % ацильних ланцюгів кардіоліпіну. Молекули кардіоліпіну, які містять 4 лінолевих кислоти у своєму складі – тетра-лінолеїлкардіоліпіни складають більш ніж 77 % від загального кардіоліпіну в серці [62, 63, 64] і близько 55 % молекулярних видів кардіоліпіну в печінці [65]. В скелетній



мускулатурі вміст кардіоліпіну складає до 20 % від усіх фосфоліпідів мітохондрій, близько 73 % якого представлено тетралінолеїлкардіоліпіном [66]. Незважаючи на домінування лінолевої кислоти в складі кардіоліпіну в інсулін-чутливих тканинах [67] жирнокислотний склад кардіоліпіну в інших тканинах може суттєво відрізнятися. Так, наприклад, в мозку різноманітність ізоформ кардіоліпіну значно більша, ніж в інших тканинах [57]. За допомогою поєднання методів мас-спектрометрії та аналітичної хімії було встановлено, що в мозку у складі кардіоліпіну переважають довголанцюгові поліненасичені жирні кислоти включаючи докозогексаєнову кислоту (C22:6) и арахідонову (C20:4), стеаринову (C18:0) та олеїнову (C18:1) [68, 69], в той час як лінолева кислота складає лише 5 % жирнокислотного складу кардіоліпіну в цьому органі [70]. При дослідженні розподілу кардіоліпіну в мозку було встановлено, що найбільша кількість кардіоліпіну виявлена в мітохондріях гіпокампу, у порівнянні з цими органелами в таламусі та кортексі для більшості молекулярних видів кардіоліпіну. В гіпокампі у шарі пірамідальних клітин DG та областях CA3 виявлено високий вміст кардіоліпіну, тоді як у білої речовині мозку відмічається відносно низка щільність кардіоліпіну в мітохондріях [57]. Таке розподілення кардіоліпіну у структурах мозку автори пов'язують з основними функціями кардіоліпіну: структурної організації комплексів електрон-транспортного ланцюга і білків мітохондріальної мембрани та сигнальними функціями кардіоліпіну. Передбачається, що насичені, мононенасичені та симетричні види кардіоліпіну, що містять лінолеїл, необхідні для структурної організації, тоді як, кардіоліпін в таламусі і гіпокампі містить арахідонову і докозогексаєнову кислоти та можуть служити субстратом для певних сигнальних ліпідів [57].

Дослідженнями Amoscato та співавторів показано, що до складу кардіоліпіну у хороїдному сплетінні мозку входять арахідонові кислоти, що можуть бути попередниками тромбоксанів – основних сигнальних ліпідів, які продукуються у хороїдному сплетінні [57]. Роль гіпокампу в навчанні,

пам'яті і просторової орієнтації дозволяє припустити, що різноманітність поліненасичених жирних кислот у складі кардіоліпіну необхідна для виконання сигнальних ролей, суттєвих для гомеостатичних і регуляторних функцій включаючи клітинну проліферацію, диференціацію і синаптогенез. Amoscato та колегами показано, що кластери кардіоліпіну які містять C20:4, C22:6 ацильні ланцюги розташовані у специфічних областях таламусу, гіпокампу і кортексу. Ці поліненасичені жирні кислоти у складі кардіоліпіну є потенційно чутливими до атак цитохрому c або  $H_2O_2$  і вивільняються при гідролізі фосфоліпази A2, що може призвести до утворення різноманітних ліпідних месенджерів у цих відділах мозку [57].

У ряді досліджень виявилось, що кардіоліпін вивільняється лише при денатурації білків, що передбачає роль цього ліпиду в підтримці третинної структури білків [71, 72]. Крім того, було показано, що кардіоліпін необхідний для підтримки четвертинної структури комплексу III (цитохром bc<sub>1</sub>) [73], а комплекс V респіраторного ланцюга має високу спорідненість до молекул кардіоліпіну [74]. Вважається, що утворення надскладних суперкомплексів респіраторного ланцюга залежить від кардіоліпіну. Так, Bazán і співавторами шляхом додавання кардіоліпіну до протеоліпосом, які містили фосфатидилхолін і фосфатидилетаноламін з суперкомплексів мітохондрій дріжджів, вдалося отримати повноцінні надскладні III і IV комплекси респіраторного ланцюга. Авторами доказано, що саме додавання кардіоліпіну, але не інших аніонних ліпідів, призводило до створення надскладних суперкомплексів респіраторного ланцюга. Це передбачає, що змінюючи рівень кардіоліпіну можна керувати рівновагою між окремими дихальними комплексами в природних умовах [75]. Крім того, кардіоліпін виступає як ділянка зв'язування  $Ca^{2+}$ , що призводить до збільшення проникності мембран мітохондрій [76]. Функції кардіоліпіну полягають також в запобіганні осмотичної нестабільності і роз'єднання комплексів в умовах підвищення інтенсивності дихання [77, 78]. Кардіоліпін також задіяний в інших функціях мітохондрій, таких як транслокація

холестеролу з зовнішньої до внутрішньої мембрани, активація мітохондріального холестеролу шляхом розщеплення бічних ланцюгів та імпорт білків в мітохондрії [79]. Повідомляється також, що при зниженні рівня кардіоліпіну в мітохондріях спостерігається пригнічення роботи електрон-транспортного ланцюга [80]. А вивільнення щільно пов'язаного з кардіоліпіном цитохрому c із мітохондрій є сигналом до запуску апоптозу [45, 80].

Одним з основних механізмів запуску апоптозу є мітохондріальний механізм. Усередині мітохондрій виявлено ряд білків (цитохром c, Smac/Diablo, HtrA2/Omi, ендонуклеаза G, AIF та ін.), які при вивільненні з мітохондрій в цитоплазму запускають апоптоз [81]. Встановлено, що мітохондрії не тільки приймають і координують сигнали, що запускають механізми гибелі клітини, але й самі продукують такі сигнали. Найбільш досконало вивчений механізм участі мітохондрій у програмованій гибелі клітин – це вихід апоптогенних білків, а саме цитохрому c до цитоплазми.

Цитохром c електростатично і гідрофобно пов'язаний з внутрішній мембраною мітохондрій через фосфоліпіди, переважно через кардіоліпін. Позитивно заряджені залишки амінокислоти лізину в цитохромі і негативно заряджені фосфатні групи в молекулі кардіоліпіну електростатично взаємодіють між собою. За рахунок гідрофобної взаємодії між вуглецевим ланцюгом цього фосфоліпіду і гідрофобними ділянками молекули цитохрому c, ще більш зміцнюється зв'язок ферменту з мітохондріальною мембраною, що забезпечує навіть часткове занурення цитохрому c в її шар. Отже, для виходу цитохрому c в цитоплазму одного лише порушення цілісності мембрани мітохондрій недостатньо. Електростатично зв'язаний цитохром c може від'єднатися від кардіоліпіну, якщо змінюється іонна сила, щільність поверхневого заряду або рН, а гідрофобний зв'язок – за рахунок окисної модифікації ліпідів мітохондрій. Останню реакцію, як раз і викликають активні форми кисню, які неминуче утворюються за будь-яких потужних стресових впливів, а відкриття пори посилює цей процес. Крім того, у

зміненої, частково розгорнутої конформації цитохром с проявляє пероксидазну активність і збільшує окислення кардіоліпіну [82]. Передбачається, що пероксидація кардіоліпіну, що каталізується цитохромом с, починає низку подій, що призводять до виходу цитохрому с з мітохондрій і запуску апоптозу [83, 84]. Таким чином, вочевидь важлива роль кардіоліпіну у виході цитохрому с з мітохондрій і запуску механізмів клітинної загибелі.

В даний час виділяють три основні категорії зміни профілю кардіоліпіну у клітинах: це зниження його вмісту, пероксидація кардіоліпіну і зміна жирнокислотного складу. Основною причиною втрати кардіоліпіну є посилення його деградації (гідроліз ендогенними фосфоліпазами) або пригнічення синтезу *de novo* в результаті порушення роботи ферментів залучених до його біосинтезу. Кардіоліпін також знижується, якщо зменшується біодоступність його попередників. Крім того, при дослідженні кардіоліпіну в гомогенатах тканин встановлено, що зменшення кардіоліпіну може бути пов'язане зі зниженням маси мітохондрій в клітинах.

Встановлено, що в нормі кардіоліпін розташований у внутрішній мембрані мітохондрій, де цей фосфоліпід бере участь в функціонуванні електрон-транспортного ланцюга і підтримці структури крист [28, 29, 31, 32]. Однак останні дослідження виявили нову роль кардіоліпіну у сигнальній трансдукції. Так, було виявлено екстерналізацію кардіоліпіну на поверхні мітохондрій в клітинах мишачого легеневого епітелію MLE-12 і людських клітин аденокарциноми HeLa при мітофагії, що індукована протоніформним роз'єднувачем, карбонільним ціанідним м-хлорфенілгідрозом [43]. Показано, що при пошкодженні мітохондрій або деполаризації мембран кардіоліпін екстерналізується в зовнішній шар мембрани мітохондрій та може залучатися до процесів мітофагії [41, 42]. Крім того, на культурі первинних кортикальних нейронів та клітинах нейробластоми SH-SY5Y встановлено, що екстерналізований кардіоліпін у зовнішній мембрані мітохондрій безпосередньо взаємодіє з мікротрубочко-асоційованим білком -

LC3, який є компонентом аутофагосоми, та запускає мітофагію [45]. В той же час білок Beclin1, задіяний у таких біологічних процесах, як апоптоз та автофагія має спорідненість до збагачених кардіоліпіном ділянок мембрани мітохондрій [44]. Таким чином, вважається, що транслокація кардіоліпіну з внутрішнього до зовнішнього шару мембрани мітохондрій може свідчити про дисфункцію цих органел та слугувати сигналом до запуску процесів мітофагії, знищуючи пошкоджені органели [45]. Однак самі механізми транслокації кардіоліпіну в зовнішню мембрану мітохондрій лишаються невідомими. Для переміщення кардіоліпіну у зовнішню мембрану необхідно перетнути внутрішню мембрану, міжмембранний простір та зовнішню мембрану. Недавні дослідження показують, що гексамерний міжмембранний просторовий білок, NDPK-D (NM23-H4), зв'язує кардіоліпін і полегшує його перерозподіл в мембрані мітохондрій [43].

На підставі вище приведеного можна зробити наступні висновки: кардіоліпін – це унікальний фосфоліпід, який грає важливу роль у таких ключових біологічних процесах як поділ клітини, апоптоз, мітофагія і відповідь на стрес. Кардіоліпін необхідний для оптимального функціонування багатьох дихальних та АТФ-синтезуючих ферментів. Зниження рівня цього фосфоліпіду призводить до розвитку дисфункції мітохондрій, а транслокація кардіоліпіну у зовнішню мембрану мітохондрій приймає участь у трансдукції сигналу мітофагії та апоптозу і як наслідок до розвитку різних патологій, більшість з яких асоціюється зі старінням.

## **1.2 Особливості метаболізму кардіоліпіну у процесі онтогенезу і при різних патологічних станах**

Вікові зміни метаболізму різних груп ліпідів підвищують ризик виникнення і розвитку низки патологічних станів, асоційованих зі старінням: жирової дистрофії печінки, діабету, різних нефропатій, атеросклерозу та

інших захворювань [1, 2, 3, 4]. Крім того, багатьма дослідниками вважається, що розвиток цих патологій пов'язаний з порушенням роботи мітохондрій. З огляду на те що кардіоліпін є фосфоліпідом важливим для функціонування цілого ряду мітохондріальних процесів, при дослідженні різних захворювань особлива увага приділяється вивченню метаболізму кардіоліпіну.

Оскільки серце вважається органом багатим на кардіоліпін, порушення метаболізму цього ліпиду в першу чергу асоціюється з різними кардіологічними патологіями. Відомо, що лінія щурів SHHF (щери зі спонтанною гіпертензією та серцевої недостатністю) часто використовується у якості моделі серцевої недостатності людей, що супроводжується розширеною кардіоміопатією [30, 85]. Було продемонстроване, що гіпертонічні захворювання у самок щурів SHHF з'являються приблизно у віці 3-місяців, і цей розлад прогресує до відкритої гіпертонії к 5-місячному віку. Дослідження змін рівня кардіоліпіну під час гострої серцевої недостатності в серці людей, та щурів SHHF виявили зниження вмісту цього ліпиду в наслідок зниження активності мітохондріальних ферментів біосинтезу кардіоліпіну: цитидиндифосфатацигліцеролсинтази та кардіоліпінсинтази [86]. Крім того, зниження рівня кардіоліпіну відмічалось в серці при ішемії, та в умовах, що призводять до зниження мітохондріальної респіраторної функції [34]. Кардіоліпін є необхідним для підтримки мембранного потенціалу мітохондрій. Падіння мембранного потенціалу, що виникає при зниженні рівня кардіоліпіну, веде до дефектів транспорту протеїнів та порушенню функцій мітохондрій [87]. Вважається, що при ішемії-реперфузії в серці щурів спостерігається підвищення вмісту активних форм кисню, які викликають пошкодження кардіоліпіну, внаслідок чого порушується робота 1, 3 та 4 комплексів респіраторного ланцюга, що призводить до дисфункції мітохондрій і розвитку серцевої недостатності [37]. Так, роботами Paradies та співавторів показано, що експериментальна ішемія-реперфузія серця щурів призводить до 50 % зниження рівня кардіоліпіну та супроводжується зниженням активності 1 комплексу респіраторного ланцюга на 48 % в

порівнянні з серцем контрольних щурів [37]. Ці результати узгоджуються з аналогічними дослідженнями, в яких зниження вмісту кардіоліпіну, формування його лізо-похідних та набухання мітохондрій спостерігалось в серці собак, котів, кролів і людини при ішемії [88, 89]. Відмічається, також, що при ішемії міокарда зниження рівня кардіоліпіну в мітохондріях не супроводжується зміною інших фосфоліпідів, що передбачає щільний взаємозв'язок метаболізму кардіоліпіну із серцевою недостатністю [90].

Крім того, вважається, що серцева недостатність є однією з найпоширеніших причин смерті хворих на діабет. Вивчення механізмів розвитку серцевої недостатності при цукровому діабеті показало, істотне зниження вмісту кардіоліпіну в інтерфібрилярній субпопуляції мітохондрій серця. Подальші дослідження діабету, індукованого стрептозоцином, в мишей FVB, за допомогою вестерн-блот аналізу виявили, що причиною зниження рівня кардіоліпіну явилось пригнічення активності кардіоліпінсинтази, ферменту що забезпечує останній етап синтезу кардіоліпіну з фосфатидилгліцеролу [91].

В сучасних роботах процеси старіння зазвичай пов'язують з порушенням роботи мітохондрій та значним зниженням здатності цих органел генерувати енергію [92]. Відповідно до мітохондріальної теорії старіння, мітохондріальна дисфункція широко розглядається як основний фактор вікових процесів [93]. У людей похилого віку мітохондріальна ДНК в клітинах серця і мозку має дефекти, які не виявляються в ембріональних тканинах. Вважається, що мітохондріальна ДНК особливо чутлива до окислення, тому вона легко піддається атаці вільних радикалів. А оскільки саме мітохондрії є основним джерелом і мішенями шкідливих реакцій, ініційованих у зв'язку з віковим погіршенням клітинних функцій, передбачається можливість того, що хронічна дія активних форм кисню на мітохондріальну ДНК може поступово порушувати функціонування мітохондрій в старіючому організмі [93]. Реакції, що призводять до посилення генерації реактивного типу кисню, мутацій мітохондріальної ДНК

та окислення мітохондріальних білків, призводять до подальшої індукції апоптотичних подій, порушення окислювального фосфорилування мітохондрій та аутофагії. Наслідком пошкодження великої кількості мітохондрій в старіючих клітинах та тканинах є дефіцит енергії та часткова загибель клітин, що у свою чергу може порушувати роботу цілого органу.

Разом з дослідженнями функціонального стану мітохондрій при старінні важливу роль відіграє аналіз мітохондріальних ліпідів і зокрема кардіоліпіну. Вивчення вмісту кардіоліпіну протягом онтогенезу виявило, що у деяких ліній щурів (Вістар, Фішер 344, SHHF) при старінні вміст цього ліпиду в серці і печінці знижується у порівнянні з таким в молодих тварин [94, 95, 96]. Так, McMillin J.B. та співавтори показали, що у 28-30-місячних щурів самців лінії Фішер 344 вміст кардіоліпіну в серці знижується порівняно з 15-місячними тваринами [96]. У експериментах на 5-, 15- та 22-місячних самцях щурів SHHF (щурів зі спонтанною гіпертензією та серцевої недостатністю), показано, що у 22-місячних тварин вміст кардіоліпіну значно зменшується у порівнянні з 5- і 15- місячними щурами [97]. Проте, деякі дослідники не виявили вікових змін рівня кардіоліпіну. Так, при вивченні фосфоліпідного складу мітохондрій серця щурів Фішер 344 Moghaddas і співавторами було показане відсутність вікових змін вмісту кардіоліпіну і інших мітохондріальних фосфоліпідів [46]. У зв'язку, з чим вікові особливості метаболізму кардіоліпіну в різних тканинах потребують подальших досліджень.

У той же час, вважається, що не тільки вікове зниження вмісту кардіоліпіну і збільшення рівня окиснення форм цього ліпиду призводить до розвитку патологій, а й змінення жирно-кислотного складу кардіоліпіну може призводити до зниження мембранного потенціалу і пригнічення активності комплексів дихального ланцюга.

Так, відзначається, що акумуляція коротколанцюгових молекулярних видів кардіоліпіну в гіпокампі трансгенних мишей з дефіцитом кальцій-незалежної фосфоліпази A2 гамма призводить до порушення біоенергетичної



функції мітохондрій, порушення клітинного сигналіngu і характеризується когнітивними розладами [16]. В даний час, встановлено, що розвиток мітохондріальних дисфункцій в головному мозку з віком, як правило, корелює з розвитком нейродегенерації. Так, в синапсах мозку мишей з хворобою Альцгеймера спостерігалось зменшення рівня АТФ, пов'язане зі зниженням активності комплексу 1 респіраторного ланцюга на 50 %, внаслідок змін фосфоліпідного складу синаптичних мембран мітохондрій [36]. Ці зміни характеризувалися порушеннями метаболізму кардіоліпіну, що узгоджується з уявленнями про щільний взаємозв'язок між окисненням кардіоліпіну, дисфункцією мітохондрій і апоптозом при розвитку атеросклерозу [98]. Крім того, істотна роль в патогенезі хвороби Паркінсона належить загибелі нейронів внаслідок появи в чорній субстанції дефектних мітохондрій, в яких кардіоліпін порушений дією окисного стресу [99, 100]. У той же час, при гострому пошкодженні тканин мозку спостерігається підвищена генерація окиснених видів кардіоліпіну, і розвиток апоптотичної відповіді тканин головного мозку щурів, в той час як терапевтичні агенти, що дозволяють захистити кардіоліпін від окиснення, призводили до зниження апоптозу і попереджали загибель нейронів [101, 102].

Вивчаючи серйозне хронічне, метаболічне, мультисистемне захворювання – синдром Барта, що характеризується кардіоміопатією, нейтропенією, міопатією та затримкою росту, групою дослідників було встановлено, що цей синдром обумовлений мутаціями в гені TAZ, що кодує тафаззин – фермент фосфоліпід-лізофосфоліпідтрансацилазу, яка бере участь у біосинтезі кардіоліпіну [53]. Цей фермент каталізує перенесення лінолевої кислоти з фосфатидилхоліну на монолізокардіоліпін і є необхідним для синтезу кардіоліпіну у еукаріот [53]. Одним з результатів мутації є нездатність мітохондрій підтримувати необхідне виробництво АТФ.

Порушення метаболізму кардіоліпіну з віком, внаслідок підвищеної активації фосфоліпаз A2 або посилення перекисного окислення ліпідів призводить до розвитку різних патологій, в той час як введення ліпосом з

кардіоліпіном старим тваринам [103, 104, 105] або в середу інкубації їх клітин призводило до нормалізації функцій мітохондрій, відновленню мембранного потенціалу і запобігало розвитку апоптозу [39]. Так, додавання екзогенного кардіоліпіну або фосфатидилгліцеролу до середовища інкубації мітохондрій, які були виділені з мозку щурів, нормалізувало мембранний потенціал і запобігало вивільненню цитохрому с з мітохондрій і запуску апоптозу [39]. Відзначається також, що в мітохондріях сердець старіючих тварин активність цитохром с оксидази відновлювалася до рівня молодих при дії екзогенного кардіоліпіну [104]. Крім того, зростання вмісту і біосинтезу кардіоліпіну спостерігалось в регенеруючій печінці, внаслідок збільшення активності монолізокардіоліпінацилтрансфери – ферменту ресинтезу кардіоліпіну [35], що дозволяє розглядати нормалізацію вмісту кардіоліпіну і підтримання його рівня в мітохондріях, як важливий механізм корекції патологій асоційованих із старінням.

У той же час кардіоліпін разом з лецитином та холестериним використовується у якості антигену в діагностичному тесті на сифіліс. Крім того, кардіоліпін широко використовується для детекції антифосфоліпідних антитіл, які ще називають анти-кардіоліпіновими антитілами. Встановлено, що анти-кардіоліпінові антитіла підвищуються при інфаркті міокарда, інсультах, системному червоному вовчаку, атеросклерозі, автоімунних захворюваннях, акушерської патології пов'язаної з розвитком антифосфоліпідного синдрому.

Таким чином кардіоліпін вважається важливим мітохондріальним ліпідом, який відіграє суттєву роль у функціонуванні білкових комплексів дихального ланцюга та запобіганні апоптозу і загибелі клітин. У зв'язку з чим порушення метаболізму кардіоліпіну і зниження його рівня спостерігається при захворюваннях, патогенез яких пов'язаний з посиленням апоптозу: хвороба Альцгеймера, бічний аміотрофічний склероз, хвороба Паркінсона, мозочкові дегенерації. Наявність чотирьох ненасичених жирних кислот (зокрема лінолевої кислоти) у складі кардіоліпіну представляє

підвищений ризик для окиснення та пошкодження молекули кардіоліпіну. В той же час, зниження рівня кардіоліпіну у процесі онтогенезу лишається не до кінця вивченим, оскільки результати отримані різними дослідниками виявляються суперечливими та відрізняються у залежності від об'єкту досліджень. У зв'язку з вище наведеним, представляється актуальним вивчення метаболізму кардіоліпіну у процесі старіння, при дії різних модуляторів ліпідного метаболізму та дослідження взаємозв'язку між рівнем кардіоліпіну в тканинах і клітинах та їх функціональним станом.

### **1. 3 Роль сфінголіпідів у порушенні функціонального стану клітин і тканин**

У більшості типів клітин однією з ключових подій при апоптозі є вивільнення з мітохондрій проапоптотичних білків до цитоплазми. Детальне дослідження механізмів розвитку апоптозу виявило, що цьому процесу сприяє формування керамідних каналів у зовнішній мембрані мітохондрій [19]. Відомо, що керамід є важливим сфінголіпідом, що входить до складу плазматичної мембрани і грає важливу роль в її структурно-функціональній організації. Крім структурної функції, керамід може виступати в ролі вторинного месенджера при передачі різноманітних сигналів та грає важливу регуляторну роль при апоптозі, індукуючи вивільнення проапоптотичних білків з мітохондрій [5, 6, 7, 19].

В останні роки з'явилося багато даних, що припускають щільний взаємозв'язок між метаболізмом кераміду та мітохондріями, і дозволяють багатьом дослідникам відокремити мітохондрії як спеціалізований компартмент метаболізму сфінголіпідів з власною субпопуляцією ферментів синтезуючих і метаболізуючих керамід. Так, знайдений вміст різних сфінголіпідів в мітохондріях, включаючи сфінгомієлін і керамід [106, 107] передбачає створення кераміду безпосередньо в цих органелах. Ця гіпотеза підтверджується локалізацією в мітохондріях ряду ферментів, що беруть

участь в метаболізмі сфінголіпідів. Так, в мітохондріях мозку бика був знайдений фермент синтезу кераміду – керамідсинтаза [108, 109, 110]. Показане, що специфічна активність керамідсинтази з мітохондрій у 2 рази вище, ніж в ферменту, що був вилучений з ендоплазматичного ретикулуму [110]. Подальші дослідження субмітохондріальної активності керамідсинтази виявили, що керамід може синтезуватися як на зовнішній, так і на внутрішній мембрані мітохондрій [111]. Останні дослідження характеризують деякі ізоформи керамідсинтаз (CerS1, CerS2, CerS4 і CerS6) в очищених мітохондріях з мозку мишей [23, 112], це також дозволяє припустити, що синтез деяких ферментів синтезуючих керамід має бути локалізований у мітохондріях [113]. Крім того, вибіркового гідролізу мітохондріального пулу сфінгом'єліну з утворенням кераміду при дії бактеріальної сфінгом'єлінази на мітохондрії веде до апоптозу. І, навпаки, генерація керамідів у плазматичній мембрані, ендоплазматичному ретикулумі або апараті Гольджі при дії сфінгом'єлінази на ці компартменти клітини не мало ефекту на клітинну життєздатність [26]. Незаперечні докази участі мітохондріального пулу кераміду у процесі апоптозу були продемонстровані на клітинах нематоди *Caenorhabditis elegans*, де апоптоз індукований іонізуючою радіацією був зупинений інактивацією керамідсинтази і відновлений мікроін'єкцією довголанцюгових керамідів [114].

Непряма модуляція керамідом функціонального стану мітохондрій може бути опосередкована зміною співвідношення про- та антиапоптотичних білків сімейства Bcl-2 на зовнішній поверхні мітохондріальної мембрани. Пряма дія кераміду на мітохондрії можлива за допомогою формування каналів для вивільнення цитохрому c у зовнішній мембрані мітохондрій, або відкриття мітохондріальної пори у внутрішній мембрані цих органел у присутності  $\text{Ca}^{2+}$ , а також завдяки активації Bax на зовнішній мембрані мітохондрій, або пригніченні респіраторного ланцюга з подальшим накопиченням активних форм кисню. В даний час показано, що керамід,

може прямо [21, 115] або опосередковано [116] впливати на респіраторний ланцюг [117], викликаючи сильне пригнічення початкового етапу дихального ланцюга. Гальмування головного потоку електронів по дихальному ланцюгу стимулює утворення активних форм кисню, по-перше, через збільшення часу життя відновлених переносників електронів на початку цього ланцюга і, по-друге, через підвищення внутрішньоклітинної концентрації кисню, який вже не відновлюється цитохромоксидазою. Стимуляція утворення активних форм кисню в мітохондріях веде до відкриття мітохондріальної пори і запуску подальшого апоптозного каскаду.

Сфінголіпіди є також важливими компонентами клітинних мембран, причому сфінгомієлін є структурним ліпідом мембранного бішару, а його метаболіти і прекурсори виконують як структурні, так і сигнальні функції [5, 6, 7]. Церамід є метаболітом сфінгомієліну і не тільки структурує кластери мембран навколо трансмембранного протеїну, утворюючи рафти, але і виступає в ролі вторинного месенджера в ряді сигнальних каскадів пов'язаних в першу чергу з регуляцією життєздатності [7]. Вступаючи в антагоністичні відносини з вітальними сигнальними шляхами, церамід-залежний каскад в основному є тригером апоптозу [7, 118, 119]. Інші сфінголіпіди, такі як сфінгозин і сфінганін, також функціонують як проапоптотичні фактори, тому вважається, що баланс між церамідом, сфінгозин-1-фосфатом і іншими апоптотичними сфінголіпідами відіграє критичну роль у регуляції церамід-індукованого апоптозу. Так, сфінгозин і церамід індукують арешт клітинного циклу, і беруть участь в рецептор-залежному апоптозі, тоді як сфінгозин-1-фосфат сприяє підтримці клітини під час поділу за рахунок пригнічення диференціювання і сприяє виживанню клітин [120, 121, 122].

Біосинтез сфінголіпідів *de novo* починається з конденсації серину і пальмітоїл-коензиму А за допомогою серинпальмітоїлтрансферази (Рис. 1.3). Отриманий 3-кетосфінганін розщеплюється ферментами в дигідросфінгозин при дії 3-кетосфінганінредуктази. Дигідросфінгозин є субстратом для

дигідроцерамідсинтази, яка продукує широкий спектр дигідроцерамідів з різною довжиною ланцюга (від C14:0-дигідроцерамиду до C26:0-дигідроцерамиду). Дигідроцераміди при дії дигідроцераміддесатураз можуть перетворюватися в церамід. Надалі церамід при дії церамідази метаболізується в сфінгозин, що фосфорилується сфінгозинкіназою з утворенням сфінгозин-1-фосфату [5, 123, 124].

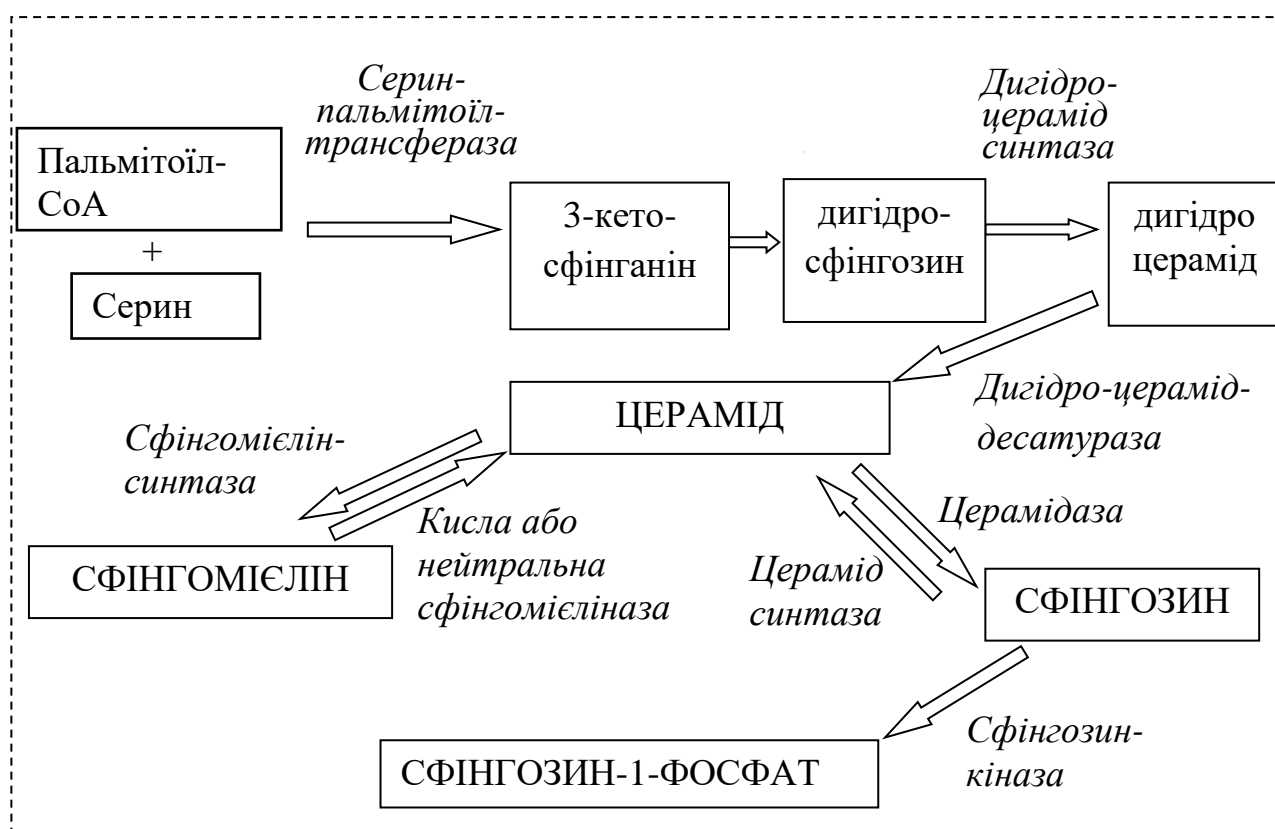


Рис. 1.3 Шляхи біосинтезу сфінголіпідів

В даний час, передбачається, що різні молекулярні види цераміду (Рис. 1.4) можуть відрізнятися внутрішньоклітинною локалізацією і біологічними ефектами [125]. Вважається, що коротколанцюгові штучно-синтезовані цераміди (D-еритро-N-ацетилсфінгозин (C2-церамід) і (C6-церамід) N-гексаноїл-D-сфінгозин) легше проникають в клітини у порівнянні з довголанцюговими природними аналогами, що синтезуються в ендоплазматичному ретикулумі [126]. Так, експерименти, що були проведені з синтетичним аналогом цераміду, маючим скорочений жирнокислотний

ланцюг, D-еритро-N-ацетил-сфінгозином (C2-церамід), показали, що церамід здатен індукувати загибель клітин за апоптотичним типом, викликаючи міжнуклеосомну деградацію ДНК і певні морфологічні зміни в структурі клітини [127, 128]. При дослідженні впливу екзогенних церамідів з різною довжиною ацильного ланцюга на функціональний стан клітин встановлено, що при інкубації гепатоцитів з C16-, C18-, C6- або C2-церамідами, лише коротколанцюгові цераміди пригнічували активність фосфоліпази Д, яка була індукована факторами росту і інсуліну [129, 130].

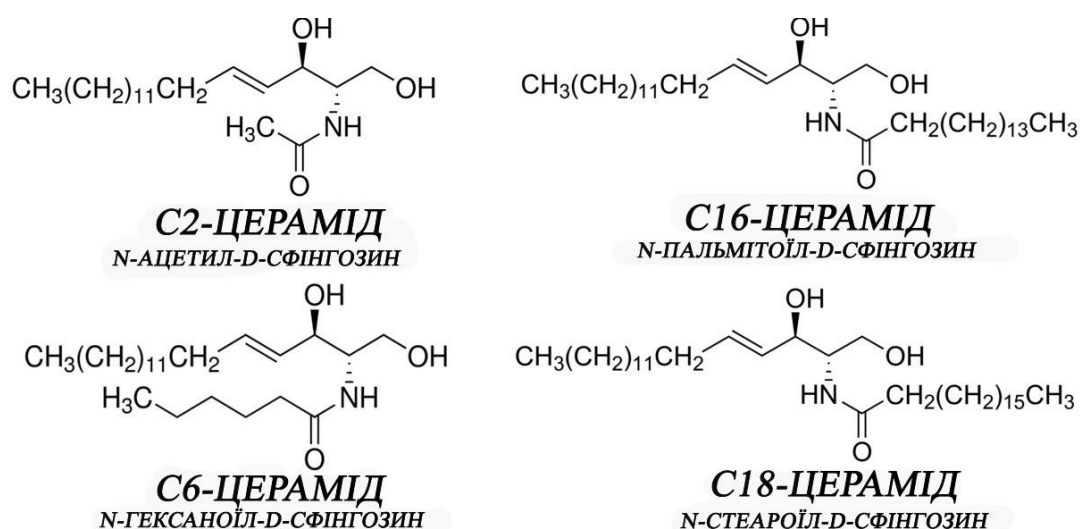


Рис. 1.4 Цераміди з різною довжиною ацильних ланцюгів

Крім того, церамід може впливати на метаболізм різних груп ліпідів у клітині. Так, на клітинах ВНК (Baby Hamster Kidney), було показано, що екзогенний C2-церамід (20μM) вже після 2 годин інкубації, викликав пригнічення синтезу фосфатидилхоліну, холестерину, сфінголіпідів та підсилював синтез диацилгліцеролів, що зв'язують з пригніченням цитидилтрансфераз і гальмуванням нормального біосинтезу сфінгом'єліну [131].

Встановлено, що різке збільшення цераміду в клітинах при дії різних токсичних речовин призводить до активування ряду сигнальних шляхів (ERK, p38), залучених у реалізацію програми апоптозу і передуює розвитку

запальних реакцій і гибелі клітин у різних тканинах [132, 133]. Так, показано, що в апоптозі кардіоміоцитів, що індукується церамідом, залучена мітоген-активуема протеїнкіназа p38 [134]. Біологічно активні сфінголіпіди можуть інгібувати цілий ряд молекул, що беруть участь у передачі гормональних сигналів у клітинах, таких як Akt/протеїнкіназа В та фосфоліпаза Д. Крім того, цераміди, що синтезуються в ендоплазматичному ретикулумі, можуть проникати в мітохондрії крізь мембранні контакти та збільшувати проникність мембран для цитохрому с і аденілаткінази [23].

Крім структурної функції цераміди можуть виступати у ролі вторинних месенджерів при передачі різноманітних сигналів. Порушення в обміні цераміду і метаболічно пов'язаних з ним сфінголіпідів, може бути причиною серйозних патологій. У зв'язку з проапоптотичними ефектами цераміду, його роль як вторинного месенджера висока у процесах деградації тканин на різних етапах онтогенезу, у протипухлинних захисних механізмах і процесах старіння організму [8, 135]. Серед вроджених патологій, пов'язаних з недостатньою продукцією цераміду, порушеннями в роботі сфінгом'єлінового циклу, а саме, ферментів сфінгом'єліназ, можна відокремити синдром Німанна-Піка, викликаний мутаціями в гені кислої лізосомальної сфінгом'єлінази SMPD1, і як наслідок, неможливістю сфінгом'єліну перетворюватись на церамід. З іншого боку, з надмірним накопиченням цераміду в клітині сьогодні пов'язують такі патології, як синдром Альцгеймера, алкогольні та неалкогольні жирові гепатози печінки, стеатози, що виникають при хронічних гепатитах, а також низка хронічних захворювань [136, 137] і патологічних процесів, асоційованих зі старінням [138].

В той же час, роль церамідів у патогенезі визначається не тільки їх участю в апоптотичному сигналінгу, а також і в роботі інших регуляторних сигнальних каскадів в клітині. Показане, що надмірне накопичення в клітинах цераміду призводить до пригнічення сигнальних шляхів, відповідальних за передачу різних гормональних сигналів і може поступово



викликати інсулінрезистентність [138]. Крім перерахованих вище специфічних ефектів цераміду, слід відзначити центральну роль цього ліпиду у розвитку реакцій стресу в клітині. Передбачається, що церамід координує відповідь на стрес у клітині, механізм якої є універсальним для різних еукаріотичних організмів [139].

У більшості тканин церамід є мінорним компонентом клітинних мембран, тому основним джерелом сигнальних молекул цераміду, що задіяні в цитоплазматичних сигнальних каскадах, є деградація мембранного сфінгомієліну [140, 141]. Показане, що на вміст цераміду в клітинах різних тканин значно впливає активність ферментів групи сфінгомієліназ, причому ряд досліджень вказує на провідну роль лізосомального пулу сфінгомієліназ, так званих кислих сфінгомієліназ [142, 143]. Так, показане зростання активності кислих сфінгомієліназ у різних тканинах старіючого організму [143, 144]. В той же час, пригнічення активності сфінгомієліназ, при їх надмірної активації може мати ряд терапевтичних ефектів у лікуванні деяких патологічних станів [145].

Таким чином, церамід є важливим ліпідом, рівень якого збільшується при старінні та у відповідь на дію різних стресорних факторів. А вивчення прямого та опосередкованого впливу цераміду на функціонування мітохондрій та ліпідів цих органел, зокрема кардіоліпіну, є ключовим к розумінню порушень метаболізму в клітині, та при розвитку патологічних станів.

## **Висновки до розділу 1**

Здійснено аналіз першоджерел щодо структури та функціональної ролі кардіоліпіну в клітинах і тканинах ссавців. Встановлено, що кардіоліпін є унікальним фосфоліпідом, який грає важливу роль у таких ключових біологічних процесах як поділ клітини, апоптоз, і відповідь на стрес. Кардіоліпін необхідний для оптимального функціонування багатьох

дихальних та АТФ-синтезуючих ферментів. Наявність 4 ненасичених жирних кислот (зокрема лінолевої кислоти) у складі кардіоліпіну представляє підвищений ризик для окиснення та пошкодження молекули кардіоліпіну. Визначено, що порушення метаболізму кардіоліпіну з віком, внаслідок підвищеної активації фосфоліпаз A2 або посилення перекісного окислення ліпідів призводить до дисфункції мітохондрій, мітофагії, апоптозу і як наслідок до розвитку різних патологій. Показано, що порушення метаболізму кардіоліпіну і зниження його рівня найчастіше спостерігається при захворюваннях патогенез яких пов'язаний з посиленням апоптозу: хвороба Альцгеймера, бічний аміотрофічний склероз, хвороба Паркінсона, мозочкові дегенерації та інші. Зниження рівня кардіоліпіну у процесі онтогенезу лишається не до кінця вивченим, оскільки результати отримані різними дослідниками виявляються суперечливими та відрізняються у залежності від об'єкту досліджень. В той же час, церамід є важливим ліпідом, рівень якого збільшується при старінні та у відповідь на дію різних стресорних факторів. А вивчення прямого та опосередкованого впливу цераміду на функціонування мітохондрій та ліпідів цих органел, зокрема кардіоліпіну, є ключовим к розумінню порушень метаболізму в клітині, та при розвитку патологічних станів.

Результати власних досліджень наведено в публікаціях [94, 95, 130, 142, 143].

## **РОЗДІЛ 2.**

### **МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

#### **2. 1 Постановка експерименту**

При виконанні даної роботи використовували самців-щурів лінії Вістар 3-, 12-, 24- та 30-32- місячного віку, які утримувались у стандартних умовах віварію Харківського Національного Університету імені В. Н. Каразіна. Всі дослідження на тваринах проводили з дотриманням Міжнародних принципів Європейської конвенції о захисті хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 1985) і національних Загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Україна, 2001). Залежно від завдань експерименти були розділені на наступні групи:

1. Досліди, що проводилися на організмовому рівні – експерименти на 1-, 2-, 3-, 12-, 24-, 30-32-місячних тваринах - пункт 2.2;
2. Досліди, що проводилися на вилученій тканині та органах – експерименти на тканинах 3-, 24-, 30-32-місячних тварин – пункт 2.3;
3. Досліди, що проводилися на виділених гепатоцитах 3- та 24-місячних тварин – експерименти на клітинах – пункт 2.4
4. Досліди, що проводилися на виділених мітохондріях печінки, серця та мозку 3- і 24-місячних щурів – пункт 2.3.5

#### **2. 2 Експерименти на тваринах**

##### **2. 2. 1 Утримання 3-місячних щурів на висококалорійному раціоні, збагаченому пальмітиною кислотою**

Для вивчення короточасного впливу високожирової дієти на вміст кардіоліпіну в тканинах 3-місячних щурів використовували опрацьовану раніше методику [146]. Дослідну групу тварин у віці 2 місяців, переводили на

дієту збагачену насиченими жирними кислотами яловичого жиру. Протягом 5 тижнів дослідні щури утримувались на раціоні, енергетична цінність якого, складала 177,99 ккал, з яких білки-18,13, жири-41,50, вуглеводи-118,36 ккал. Щури мали вільний доступ до води. Контрольна група тварин у ті ж терміни утримувалась на стандартному раціоні віварію, енергетична цінність якого, складала 146,52 ккал, з яких білки-18,13, жири-10,40, вуглеводи-118,36 ккал). Калорійність раціону щурів дослідної групи була на 21 % вища ніж в контрольних тварин. У кожному групі було обрано по 6 тварин. Після завершення експерименту щурів наркотизували діетиловим ефіром. Швидко вилучали органи та проводили екстракцію ліпідів як описано в пункті 2.5. Вміст кардіоліпіну визначали як описано в пункті 2.8.

### **2. 2. 2 Утримання щурів різного віку на калорійно-обмеженому раціоні**

Для вивчення можливостей корекції зниженого з віком вмісту кардіоліпіну використовували експериментальну калорійно-обмежену дієту за Маккеєм-Нікітіним [147]. Відповідно до результатів багаторічних досліджень В.Н. Нікітіна та співавторів [147], довічне утримання щурів в особливих умовах на повноцінній по складу, але калорійно-обмеженій дієті супроводжується збільшенням тривалості їхнього життя на 40-50 %, а в деяких випадках навіть на 100 %. Відповідно до цієї моделі експериментальних тварин у віці 1 місяця ізолювали та переводили на стримуючу ріст дієту [148]. Дієта калорійно-обмежених тварин є повноцінною за вмістом білків, вітамінів і мінеральних солей, але різко обмежена в калорійному відношенні, що веде до істотної затримки росту. Для контролю ваги тварин зважували 2 рази на тиждень, та відповідно до цих показників розраховували раціон на кожен день. За декілька днів до закінчення 100-денного періоду тваринам давали можливість збільшити вагу на 10 гр., збільшуючи кількість їжі, та знову протягом 100 днів утримували

на стримуючому зріст раціоні. Таким чином тварин утримували довічно. Загальне зниження калорійності раціону сягало 60 % від норми. У якості контролю використовували 2 групи щурів (3- та 24-місячного віку), що протягом життя отримували звичайний раціон *ad libitum*. Тварин контрольних груп також ізолювали у 2-місячному віці. Таким чином в цієї серії експериментів тварини були поділені на 4 групи (по 6 щурів у кожній): 3-та 24-місячні тварини, що отримували калорійно-обмежену дієту, і 3- та 24-місячні контрольні щури. Маса тіла тварин дослідної групи становила  $87,20 \pm 3,14$  грамів у віці 3-х місяців та  $122,80 \pm 4,63$  грамів у 24-місячних тварин. Маса тіла 3-місячних щурів контрольної групи становила  $172,44 \pm 6,16$  грамів, а контрольних 24-місячних щурів –  $445,14 \pm 11,89$  грамів. Після завершення експерименту щурів наркотизували діетиловим ефіром. Швидко вилучали органи та проводили екстракцію ліпідів як описано в пункті 2.5. Вміст кардіоліпіну визначали як описано в пункті 2.8.

### **2. 2. 3 Дослідження поведінки щурів різного віку**

Для вивчення вікових особливостей поведінки відбирали інтактних щурів 3-, 24- та 30-32-місячного віку по 6 тварин у кожену групу. З дослідними щурами проводили тести «Відкрите поле», «Темний/світлий відсік», «Перевага до розчину сахарози», «Годування в незнайомій обстановці», «Імобілізація за хвіст», «Сплеш-тест».

#### **2. 2. 3. 1 Тест «Відкрите поле»**

Тестування 3-, 24- та 30-32 –місячних тварин проводили у весняно-літній період у ранкові години. Тест у відкритому полі проводили у відповідності з описаним у літературі [149]. Тварин розміщували у центрі квадратної арени шириною 1 м і висотою стінки 50 см. Пол арени розділений на 25 квадратів. На висоті 1 метра над центром поля встановлювали лампу

накалювання напругою 75 Вт. Кожне тестування проводили у першій частині дня. При цьому реєстрували горизонтальну і вертикальну активність, частоту та тривалість грумінгових реакцій, дефекації та уринації протягом 5 хвилин спостереження.

#### **2. 2. 3. 2 Тест – «Темний/світлий відсік»**

Тест 3-, 24- та 30-32 –місячних тварин проводився у ранкові часи у затемненої затишної кімнаті у відповідності з описаним у літературі [150]. Для проведення цього тесту використовували прямокутну камеру (висотою 40 см) з двома відсіками (30х40 см), розділену перегородкою з отвором (10\*10 см). Одне відділення залишали затемненим, а друге добре освітленим лампою напругою 75 Вт. Щурів розміщували у темному відсіку звідки вони могли вільно пересуватися між відсіками. Протягом 5 хвилин шляхом візуального спостереження реєстрували латентний період виходу до світлого відсіку, загальний час надходження у світлому відсіку та вертикальну активність тварин в обох відсіках.

#### **2. 2. 3. 3 Тест «Перевага до розчину сахарози»**

Тест «Перевага до розчину сахарози» проводився у відповідності з описаним у літературі [150]. 3-, 24- та 30-32–місячних тварин розсаджували до індивідуальних кліток та надавали вільний доступ до двох однакових поїлок. В одній перебувала вода, у другій 2 % розчин сахарози. Поїлки жорстко фіксувалися на однаковому рівні і під однаковим кутом нахилу. Праве/ліве положення поїлок з сахарозою і водою регулярно змінювалося. Температура води і розчину сахарози перед заповненням поїлок доводилася до кімнатної температури. Розчин сахарози і води змінювався щодня, поїлки ретельно промивалися без використання миючих засобів. Щодня реєстрували

обсяг вжитої рідини в обох поїлках. Перевага до сахарози оцінювалася у відсотках від вжитої кількості рідини за добу, за формулою 2.1:

(2.1)

$$\text{Перевага до сахарози} = V_{\text{вжитої сахарози}} * 100 \% / (V_{\text{вжитої сахарози}} + V_{\text{вжитої води}}),$$

де

$V_{\text{вжитої сахарози}}$  — об'єм вжитої сахарози за добу;

$V_{\text{вжитої води}}$  — об'єм вжитої води за добу.

#### **2. 2. 3. 4 Тест «Годування в незнайомій обстановці»**

Тест 3-, 24- та 30-32 —місячних тварин проводився у ранкові часи, як описано раніше [150]. Тваринам пропонували звичну для них їжу в незнайомій чистій клітці, з невеликою кількістю тирси. Оцінювали час, через який тварина почне їсти після дослідницької активності. Період голодування тварин перед тестом складав 24 години (без обмеження доступу до води). Тривалість тестування кожної тварини не перевищувала 5 хвилин.

#### **2. 2. 3. 5 Тест «Імобілізація за хвіст»**

Тест проводили на 3-, 24- та 30-32-місячних тваринах як описано раніше [151, 152, 153]. Кожного щура фіксували за хвіст на відстані 3 см від тулуба, за допомогою липкої стрічки, і закріплювали в вертикальному положенні таким чином, щоб передні лапи тварини діставали до платформи. Протягом 6 хвилин оцінювали час нерухомості тварини. Для більш точної інтерпретації результатів під час тесту робили відеозапис.

#### **2. 2. 3. 6 Тест «Сплеш-тест»**

Тест проводили на 3-, 24- або 30-32-місячних щурах, як описано раніше [150, 154]. Тварині, що знаходилася у своїй клітці, на мордочку з

розпилювача наносили близько 400 мкл 10 % розчину сахарози. В'язкість і липкість цього розчину призводять до активізації грумінгових реакцій у тварин. Реєстрували сумарний час, витрачений на очисні реакції. Час тесту складав 5 хвилин.

#### **2. 2. 4 Інтраназальне введення D-еритро-N-пальмітоїлсфінгозину 3-місячним щурам**

Для вивчення залежності поведінки тварин від вмісту кардіоліпіну в структурах головного мозку, використовували модель введення екзогенного цераміду 3-місячним щурам спираючись на роботу Gulbins і співавторів [150]. Перед початком експерименту відбирали середньоактивних тварин (в яких сума горизонтальної та вертикальної активності знаходилася в межах 50-70 реакцій) шляхом тестування у «відкритому полі». Відібраних тварин 3-місячного віку розподіляли на 2 групи (n=6). Щури першої групи отримували інтраназально у кожен ніздрю по 40μМ D-еритро-N-пальмітоїлсфінгозину («Sigma», США) в етанол:додекані (49:1) і розчиненого в фізіологічному розчині (об'ємом 50 мкл) протягом 7 днів. Щури другої групи (контроль) отримували інтраназально етанол:додекан (49:1) розчинений в фізіологічному розчині (об'ємом 50мкл) протягом 7 днів.

Інтраназальне введення проводилося згідно з Hanson та співавторами [155]. Відповідно до цієї методики тварин деякий час поступово привчали до рук та знаходженню у частково іммобілізованому стані. Під час введення препарату тварин утримували за холку паралельно до підлоги, таким чином, щоб уникнути потрапляння введеного розчину у шлунок або до легень. Після завершення експерименту щурів наркотизували діетиловим ефіром. Швидко вилучали органи та проводили екстракцію ліпідів як описано в пункті 2.5. Вміст кардіоліпіну визначали як описано в пункті 2.8.

До початку експерименту і після останнього інтраназального введення проводили наступні тести: «Відкрите поле», «Темний/світлий відсік»,



«Перевага до розчину сахарози», «Годування в незнайомій обстановці», «Імобілізація за хвіст», «Сплеш-тест» (пункт 2.2.3).

### **2. 2. 5 Інтраназальне введення N-ацетилцистеїну 24-місячним щурам**

Щурів 24-місячного віку розділяли на 2 групи: 1- дослідні щури, що інтраназально отримували розчин N-ацетилцистеїну, (препарат «інгаміст» ТОВ «Юрія-Фарм», Україна) протягом 14 днів із розрахунку 50 мг N-ацетилцистеїну на 1 кг ваги щура (n=6). Контрольним щурам інтраназально вводили 1 mM розчин ЕДТА в якості контролю до препарату «інгаміст» (n=6). Інтраназальне введення проводили як описано в пункті 2.2.4.

До початку експерименту і після останнього інтраназального введення проводили наступні тести: «Відкрите поле», «Темний/світлий відсік», «Перевага до розчину сахарози», «Годування в незнайомій обстановці», «Імобілізація за хвіст», «Сплеш-тест» (пункт 2.2.3).

### **2. 2. 6 Внутрішньошлункове введення етанолу або риб'ячого жиру та кверцетину на тлі етанолу 3-місячним щурам**

Для вивчення особливостей вмісту кардіоліпіну за умов індукції накопичення ендогенних керамідів використовували етанол, який викликає підвищення вмісту кераміду [51]. Раніше співробітниками нашого відділу було продемонстроване, що короточасне (протягом 7 днів) введення 3-місячним щурам 40 % етанолу (10 мл/кг маси тіла) не надає вираженої токсичної дії на печінку, проте в корі головного мозку, гіпокампі та нирках викликає зміни вмісту ліпідів, зокрема підвищення вмісту кераміду, що характерні для старіння [51]. З огляду на це в нашій роботі використовувалась модель короточасного введення етанолу 3-місячним тваринам для моделювання змін в метаболізмі ліпідів, що відбуваються при

старінні та вивчення змін вмісту кардіоліпіну в цієї моделі. Перед експериментом з тваринами проводили тест на вибір між 15 % розчином етанолу та питною водою. Ураховуючи результати тестування, тварин, що були відібрані для експерименту, розділили на 4 групи (по 6 тварин в кожній групі). Три групи дослідних щурів, що знаходилися на стандартному раціоні віварію, протягом 7 днів отримували 40 % розчин етанолу внутрішньошлунково (добова доза – 10 мл етанолу на кг маси тіла була розділена на 2 введення – вранці, та ввечері). Контрольним тваринам два рази на добу внутрішньошлунково вводили воду в еквівалентному об'ємі.

В модельних експериментах [51] було продемонстроване, що введення до раціону щурів етанолу підвищує рівень цераміду, а додавання до раціону алкоголізованим щурам риб'ячого жиру (у якості джерела n-3 полиненасичених жирних кислот риб'ячого жиру, які є модуляторами обміну ліпідів) та кверцетину (флавоноїда, компонента рослинної їжі, який здатен регулювати активність ферментів, залучених до обміну ліпідів) дозволяло коригувати порушення обміну ліпідів і зменшувати накопичення церамідів викликане етанолом.

З огляду на це, в нашій роботі одна з вищезазначених дослідних груп тварин разом із етанолом внутрішньошлунково отримувала риб'ячий жир з печінки тріски (АТ «Галичфарм» Україна) у дозі 1 г на 100 г маси тіла, протягом 7 днів [156]. Друга дослідна група тварин разом із етанолом внутрішньошлунково отримувала кверцетин («Merck», Німеччина) у кількості 50 мг на кг маси тіла, протягом 7 днів. Враховуючи калорійність етанолу та риб'ячого жиру, раціон контрольних щурів та групи тварин що отримували кверцетин був компенсований за рахунок додавання соняшникової олії. Таким чином, дієта тварин контрольної групи складалась з 12 % білків, 14 % жирів і 74 % вуглеводів (146,52 ккал), а у щурів дослідних груп – з 9 % білків, 32 % жирів і 59 % вуглеводів (146,52 ккал). Після завершення експерименту щурів наркотизували діетиловим ефіром. Швидко

вилучали органи та проводили екстракцію ліпідів як описано в пункті 2.5. Вміст кардіоліпіну визначали як описано в пункті 2.8.

#### **2. 2. 7 Внутрішньочеревне введення доксорубіцину 3-місячним щурам**

Для вивчення особливостей вмісту кардіоліпіну за умов індукції накопичення ендогенних керамідів використовували препарат доксорубіцин (Pharmachemie B.V., Голландія), цитотоксична дія якого, відбувається за рахунок підвищення активності ферментів сфінгомієліназ, та збільшення рівня кераміду [157]. Тварин 3-місячного віку розподіляли на 2 групи, по 6 тварин в кожній. Дослідна група щурів шляхом внутрішньочеревного введення отримувала розведений у фізіологічному розчині доксорубіцин (Pharmachemie B.V., Голландія) (5 мг/кг) протягом 4 тижнів до кумулятивної дози 20 мг/кг. Контрольні тварини в цей же час отримували внутрішньочеревну ін'єкцію відповідного об'єму фізіологічного розчину. Після завершення експерименту щурів наркотизували діетиловим ефіром. Швидко вилучали органи та проводили екстракцію ліпідів як описано в пункті 2.5. Вміст кардіоліпіну визначали як описано в пункті 2.8.

#### **2. 2. 8 Внутрішньом'язове введення іміпраміну та золедронової кислоти, або внутрішньошлункове введення N-ацетилцистеїну 24-місячним щурам**

Для вивчення можливості корекції рівня кардіоліпіну в тканинах старих щурів використовували препарати іміпрамін (EGIS Pharmaceutical PLC, Будапешт, Угорщина), золедронову кислоту (Zometa, Novartis), або N-ацетилцистеїн (Sigma-Aldrich, Англія) що дозволяють модулювати обмін сфінголіпідів, впливаючи на активність сфінгомієліназ [158, 159, 160, 161]. Для вивчення дії препаратів іміпраміну, золедронової кислоти або

N-ацетилцистеїну тварини 24-місячного віку були розділені на 6 груп по 6 тварин в кожній. Першої групі внутрішньом'язово вводили іміпрамін (EGIS Pharmaceutical PLC, Будапешт, Угорщина) в дозі 10 мг/кг маси тіла протягом 14 днів [142]. Друга група отримувала внутрішньом'язово золедронову кислоту (препарат «Зомета» (Zometa, Novartis) 4 мг/5 мл) по 0,150 мг/кг маси тіла через добу протягом 10 днів. Третя група щурів – контроль до іміпраміну – тварини отримували ін'єкцію 0,9 % NaCl протягом 14 днів. Четверта група – контроль до золедронової кислоти – тварини отримували ін'єкцію 0,9 % NaCl через добу протягом 10 днів. Для вивчення модуляції вмісту кардіоліпіну за допомогою N-ацетилцистеїну п'ятій групі щурів внутрішньо шлунково вводили N-ацетилцистеїн (Sigma-Aldrich, Англія) 3 mM/кг маси тіла протягом 18 днів. Шоста група тварин протягом 18 днів внутрішньо шлунково отримувала розчин глюкози 1 % – в якості контролю до N-ацетилцистеїну (n=6). Після завершення експерименту щурів наркотизували діетиловим ефіром. Швидко вилучали органи та проводили екстракцію ліпідів як описано в пункті 2.5. Вміст кардіоліпіну визначали як описано в пункті 2.8.

## **2. 3 Експерименти на тканинах**

### **2. 3. 1 Дослідження вмісту кардіоліпіну у тканинах щурів різного віку**

Для дослідження вікових особливостей вмісту кардіоліпіну використовували інтактних молодих статевозрілих (3-місячних), дорослих (12-місячних), старих (24-місячних) і дуже старих (30-32-місячних) щурів самців лінії Wistar. З серця, печінки і неокортексу цих тварин отримували препарати тканин для кількісного аналізу вмісту ліпідів. Перед розтином черевної порожнини тварин наркотизували діетиловим ефіром. Печінку щурів, перфузували *in situ* охолодженим до  $t + 4^{\circ}\text{C}$  ізотонічним розчином

NaCl. Печінку, серце або кору мозку продавлювали крізь охолоджену перфоровану пластину з діаметром пор 0,3 мм при  $t + 4^{\circ}\text{C}$ . Для визначення вмісту ліпідів наважку тканини розтирали у гомогенізаторі з 0,9 % NaCl при  $t + 4^{\circ}\text{C}$  та використовували для подальшої екстракції ліпідів (пункт 2.5).

### **2. 3. 2 Дослідження ефекту екзогенного цераміду на вміст кардіоліпіну в тканинах мозку 3-місячних щурів**

Для дослідження вмісту кардіоліпіну в структурах головного мозку 3-місячних щурів за умов накопичення цераміду, після наркотизації тварин діетиловим ефіром, швидко вилучали мозок та виділяли гіпокамп і кору великих півкуль головного мозку на льодяний бані. Наважки кори мозку і гіпокампу 3-місячних щурів інкубували у буфері Кребс-Рінгера з додаванням 60 мкМ C16-цераміду («Sigma», США) або розчинника C16-цераміду – етанол:додекана, при  $37^{\circ}\text{C}$  протягом 1, 2 або 3 годин. Після завершення інкубації шматочки тканини відмивали буфером, подрібнювали та проводили екстракцію ліпідів як описано в пункті 2.5.

### **2. 3. 3 Дослідження ефекту екзогенного цераміду на вміст кардіоліпіну в тканинах серця 3-місячних щурів**

Для вивчення ефектів C16-цераміду («Sigma», США) на вміст кардіоліпіну у серці використовували короточасну перфузію сердець 3-місячних тварин за методом Лангендорфа [162, 163]. Серця перфузували оксигенованим буфером Кребс-Хенселейта ( $t = 37^{\circ}\text{C}$ ) з додаванням 60 мкМ C16-цераміду («Sigma», США) – дослідним зразком, або розчинника C16-цераміду – етанол:додекана – контрольним зразком. Після завершення перфузії з сердець видаляли крупні судини, подрібнювали та гомогенізували. Екстракцію ліпідів проводили як описано в пункті 2.5. Вміст кардіоліпіну визначали як описано в пункті 2.8.

### **2. 3. 4 Дослідження ефекту екзогенного кардіоліпіну на базальний та стимульований інсуліном транспорт глюкози і синтез глікогену в м'язах та мозку 3- та 24-місячних щурів**

Для вивчення ефектів екзогенного кардіоліпіну на функціональний стан скелетних м'язів виділяли литковий м'яз 3- та 24-місячних тварин та культивували у буфері Кребс-Хенселейта, що містив 118 мМ NaCl; 5 мМ KCl; 1 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 мМ  $\text{MgSO}_4$ ; 2 мМ  $\text{CaCl}_2$ ; 0,2 %  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,1 % бичачого сироваткового альбуміна («Sigma Aldrich», США); 61 мг/л пеніцилін і 100 мг/л стрептоміцин (рН 7,5; +4 °C) з екзогенним кардіоліпіном (100 нМ) («Sigma», США) протягом 1 години. Після чого до середовища культивації додавали 10 нМ інсуліну («Індар», Україна) та вивчали транспорт глюкози.

Транспорт глюкози визначали з використанням 2-D-[3H]-глюкози (0,5 мкКі/мл) (4 МБк/М, Росія) [164]. Тканини інкубували в присутності 10 нМ інсуліну («Індар», Україна) протягом 30-40 хвилин, після чого відмивали 3 рази теплим (37 °C) буфером HBS (HEPES-buffered saline, що містить 20 мМ HEPES), остання порція буфера була замінена 0,75 мл HBS, яка містила 0,5 мкКі/мл 2-D-[3H]-глюкозу (4 МБк/М, Росія). Клітини та тканини інкубували 10 хвилин при 37°C. Після чого тканини відмивали 3 рази крижаним (4 °C) буфером HBS. Для лізису до тканини додавали 1 мл 50 мМ NaOH та витримували ще 30 хвилин. Вміст міченої глюкози визначали за допомогою сцинтиляційного лічильника. При дослідженні утворення глікогену литковий м'яз культивували 60 хв при 37 °C в буфері HBS з 5мМ глюкозою, 10 нМ інсуліном (або 0,9 % NaCl) і 1 мкКі/мл D-[U14C]-глюкозою. Реакцію зупиняли крижаним 0,9 % NaCl. Тканину лізували 60 % KOH протягом 30 хв, потім до розчину додавали глікоген 1 мг/мл і кип'ятили 30 хв при 95 °C. Осад двічі відмивали крижаним етанолом і розчиняли у воді.

### **2. 3. 5 Виділення мітохондрій з печінки, серця і мозку 3- та 24-місячних щурів**

Для дослідження вікових змін вмісту кардіоліпіну в мітохондріальній фракції використовували щурів 3- та 24-місячного віку ( $n=6$ ) з печінки, серця і мозку яких виділяли мітохондрії.

Виділення мітохондрій проводили за методом Камату і співавторів [165] в модифікації Лемешко В.В. [166]. Наважку тканини продавлювали крізь прес і гомогенізували з 7-кратним об'ємом середовища для виділення на холоду у гомогенізаторі з тефлоновим товкачем 30 секунд (швидкість обертання – 1000 обертів за хвилину, зазор між склом та тефлоном – 0,2 мм). Гомогенат центрифугували при 600 g 10 хвилин у рефрижераторній центрифугі ЦЛР-1. Супернатант центрифугували при 10000 g 10 хвилин. Отриманий осад мітохондрій суспендували у 9 мл середовища для промивання, а до 12 мл постмітохондріальної фракції додавали  $\text{CaCl}_2$  до кінцевої концентрації 10 mM. Зразки утримували на льодяній бані протягом 3 хвилин, після чого суспензії мікросом і мітохондрій центрифугували одночасно при 10000 g 10 хвилин. Осад мітохондрій суспендованих в 1 мл середовища для промивання використовували для виділення ліпідів.

### **2. 4 Експерименти на клітинах**

Гепатоцити 3-, та 24-місячних тварин виділяли за методом Петренка та співавторів [167]. Нативність клітин оцінювали за допомогою 0,4 % розчину трипанового синього («Serva», Німеччина) та визначення активності лактатдегідрогенази («Філісіт-Діагностика» Україна) у середовищі інкубації. Вихід життєздатних клітин печінки 3-місячних щурів становив  $94 \pm 3,1$  %, 24-місячних тварин –  $89 \pm 2,7$  %. Свіжовиділені гепатоцити ресуспендували (до концентрації  $2 \cdot 10^6$  клітин/мл) в середовищі Ігла (Інститут поліомієліту і вірусних енцефалітів, Росія) (pH 7,4), яка містила 10 % ембріональну

сироватку (ООО “БіолоТ”, Росія), 20 мМ Hepes (“Serva”, Німеччина), пеніцилін (61 мг/л) і стрептоміцин (100 мг/л). Отримані гепатоцити використовували у наступних експериментах:

#### **2. 4. 1 Дослідження впливу тривалості культивування та різних концентрацій екзогенних керамідів на вміст кардіоліпіну у гепатоцитах 3-місячних щурів**

Для вивчення впливу екзогенних керамідів гепатоцити 3-місячних щурів інкубували протягом 1,5, 2 або 3 годин у живильному середовищі 199 («РАА», Австрія) (рН 7,4), що містив 25 мМ Hepes («Serva», Німеччина), пеніцилін (61 мг/л), стрептоміцин (100 мг/л), 10 % ембріональну сироватку бика (ТОВ «Біолот», Росія) при 37°C у присутності С2-церамиду (15, 30 або 60 мкМ, «Amersham», Англія), С16-церамиду (60 мкМ, «Sigma», США) або С18-церамиду (60 мкМ, Kaunas University of Technology, Литва). Після закінчення інкубації реакцію зупиняли холодною сумішшю хлороформ: метанол (1: 2, за об'ємом) і проводили екстракцію ліпідів як описано в пункті 2.5. Вміст кардіоліпіну визначали як описано в пункті 2.8.

#### **2. 4. 2 Дослідження впливу індукторів накопичення керамиду на вміст кардіоліпіну у гепатоцитах 3-місячних щурів**

Для вивчення вмісту кардіоліпіну в гепатоцитах за умов підвищення рівня керамиду використовували попередник синтезу керамиду – пальмітинову кислоту, або доксорубіцин – препарат, який опосередковує свої ефекти шляхом збільшення внутрішньоклітинного рівня керамиду [157]. Гепатоцити 3-місячних щурів інкубували протягом 1,5, 2 або 3 години при 37 °C у в живильному середовищі 199 («РАА», Австрія) (рН 7,4), що містило 25 мМ Hepes (“Serva”, Німеччина), пеніцилін (61 мг/л), стрептоміцин (100 мг/л), 10 % ембріональну сироватку бика (ТОВ «Біолот», Росія) у



присутності пальмітинової кислоти (0,75 mM «Sigma», США), або доксорубіцину (5,2 нМ Pharmachemie B.V., Голландія) та інгібіторів метаболізму сфінголіпідів GW4869 (20 мкМ «Sigma», США), іміпраміну (50 мкМ «Sigma», США) або міріоцину (5 мкМ «Sigma», США) на тлі доксорубіцину. Після закінчення інкубації реакцію зупиняли холодною сумішшю хлороформ: метанол (1: 2, за об'ємом). Екстракцію ліпідів проводили як описано в пункті 2.5. Вміст кардіоліпіну визначали як описано в пункті 2.8.

#### **2. 4. 3 Дослідження одночасного впливу екзогенного кардіоліпіну та індукторів накопичення цераміду на базальний та стимульований інсуліном транспорт глюкози і синтез глікогену в гепатоцитах 3-місячних щурів**

В експериментах по вивченню ефектів кардіоліпіну гепатоцити 3-місячних тварин інкубували в живильному середовищі 199 («РАА», Австрія) (рН 7,4), що містило 25 мМ Hepes («Serva», Німеччина), пеніцилін (61 мг/л), стрептоміцин (100 мг/л), 10 % ембріональну сироватку бика (ТОВ «Біолот», Росія), протягом 1 години з доксорубіцином (5,2 нМ Pharmachemie B.V., Голландія) або С16-церамідом (60 мкМ «Sigma», США) після чого до середовища культивування додавали екзогенний кардіоліпін (100 нМ, «Sigma», США) та продовжували культивування ще 1 годину. Після чого до середовища культивації додавали 10 нМ інсуліну («Індар», Україна) та вивчали транспорт глюкози з використанням 2-D-[3H]-глюкози (0,5 мкКі/мл) (4 МБк/М, Росія) [164]. Вміст міченої глюкози визначали за допомогою сцинтиляційного лічильника. При дослідженні утворення глікогену гепатоцити 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. Після закінчення інкубації реакцію зупиняли холодною сумішшю

хлороформ:метанол (1: 2, за об'ємом) і проводили екстракцію ліпідів як описано в пункті 2.5. Вміст кардіоліпіну визначали як описано в пункті 2.8.

#### **2. 4. 4 Вплив екзогенного кардіоліпіну на базальний та стимульований інсуліном транспорт глюкози та синтез глікогену в ізольованих гепатоцитах 3- та 24- місячних щурів**

Для вивчення ефектів екзогенного кардіоліпіну на функціональний стан клітин, гепатоцити 3- та 24-місячних тварин культивували в живильному середовищі 199 («РАА», Австрія) (рН 7,4), що містило 25 мМ Нерес («Serva», Німеччина), пеніцилін (61 мг/л), стрептоміцин (100 мг/л), 10 % ембріональну сироватку бика (ТОВ «Біолот», Росія) у присутності кардіоліпіну (100 нМ, «Sigma», США) протягом 1 години. Після чого до середовища культивації додавали 10 нМ інсуліну («Індар», Україна) та вивчали транспорт глюкози з використанням 2-D-[3H]-глюкози (0,5 мкКі/мл) (4 МБк/М, Росія) [164].

Вміст міченої глюкози визначали за допомогою сцинтиляційного лічильника. При дослідженні утворення глікогену гепатоцити 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. Реакцію зупиняли крижаним 0,9 % NaCl.

Після закінчення інкубації визначали кількість і життєздатність гепатоцитів (за допомогою 0,4 % розчину трипанового синього («Serva», Німеччина) та визначення активності лактатдегідрогенази («Філісіт-Діагностика» Україна) у середовищі інкубації). Проби центрифугували (5 хвилин·3000 об/хв), клітини лизували, з використанням H<sub>2</sub>O dist., та проводили екстракцію ліпідів як описано в пункті 2.5.

## **2. 5 Екстракція ліпідів печінки, серця, гіпокампу, неокортексу, ізольованих гепатоцитів та мітохондрій щурів різного віку**

Ліпіди з гомогенатів печінки, серця, гіпокампу, неокортексу (приготованих на льодяному 0,9 % NaCl), ізольованих гепатоцитів та мітохондрій екстрагували за методом Bligh, Dyer [168] в суміші хлороформ:метанол (1:2, за об'ємом), струшуючи. Отримані екстракти центрифугували 10 хвилин при 3000 об/хв. Верхню фазу відбирали і доливали хлороформ і  $H_2O$ . Проби центрифугували протягом 10 хвилин при 3000 об/хв. Верхню фазу відкидали, а нижню випаровували під вакуумом при температурі  $+37^{\circ}C$ . Сухий осад розчиняли в суміші хлороформ:метанол (2:1, за об'ємом) і використовували для тонкошарової хроматографії.

## **2. 6 Розподіл ліпідів на фракції за допомогою тонкошарової хроматографії**

Поділ ліпідів на фракції проводили за методом тонкошарової хроматографії на силікагелі (пластинки "Sorbfil", Росія). Використовували наступні системи розчинників: гексан/діетиловий ефір/крижана оцтова кислота (73:25:2, за об'ємом) для розділення нейтральних ліпідів та холестерину [169]. Для розподілення кардіоліпіну та фосфатидної кислоти використовували діетиловий ефір – 1 система та хлороформ/метанол/крижана оцтова кислота/вода (80:25:8:0,3, за об'ємом) – 2 система [170]. Ліпіди виявляли в парах йоду та ідентифікували шляхом порівняння зі стандартами.

## **2. 7 Елюювання ліпідів**

Плями ліпідів зіскоблювали з хроматографічних пластин в центрифужні пробірки, заливали 2 мл суміші хлороформ:метанол:14NNH<sub>4</sub>OH

(56: 42: 2, за об'ємом) – для фосфоліпідів інкубували на водяній бані при  $t+55^{\circ}\text{C}$  протягом 15 хвилин з подальшим центрифугуванням протягом 10 хвилин при 3000 об/хв. Елюат збирали в хімічні пробірки, операцію повторювали двічі. Об'єднані елюати випаровували насухо на водяній бані при температурі  $75-85^{\circ}\text{C}$ .

## 2. 8 Кількісне визначення ліпідів

Кількісний вміст загальних фосфоліпідів, кардіоліпіну та фосфатидної кислоти в пробах проводили за методом Bartlett [171]. У випарені ліпідні зразки додавали по 0,6 мл суміші  $\text{H}_2\text{SO}_4:70\% \text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$  (9:1:40, за об'ємом) і розміщували у блоки для спалювання на 8 годин при  $t+160^{\circ}\text{C}$ . Після охолодження до зразків додавали по 0,9 мл dist.  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 мл 0,9 %  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  і 0,2 мл 9 % аскорбінової кислоти. Вміст перемішували і інкубували 30 хвилин на водяній бані при  $t+45^{\circ}\text{C}$ . Оптичну щільність проб вимірювали при довжині хвилі 820 нм на спектрофотометрі СФ-26.

Крім того, визначення вмісту кардіоліпіну проводили методом забарвлювання флуоресцентним барвником акридин оранж 10-ноніл бромідом (Sigma-Aldrich, США), який з високою афінністю зв'язується з кардіоліпіном в мітохондріях і практично не зв'язується з його окисленою формою [172]. Клітини після відмивання переводили в свіже середовище, що містило сахарозу 250 мМ, KCl 5 мМ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,4 мМ,  $\text{MgCl}_2$  0,8 мМ, EDTA 1 мМ, бичачого сироваткового альбуміна 0,5 %. До клітин  $2 \times 10^7$  клітин/мл. додавали 20 мкм акридин оранж 10-ноніл броміду і інкубували 15 хвилин в темряві при кімнатній температурі. Після закінчення інкубації клітини центрифугували 3000 об/хв протягом 5 хвилин і проводили вимірювання. Інтенсивність флуоресценції вимірювалася на спектрофлуориметрі Hitachi 850 Fluorescent Sp. (Японія) при 518-530 нм. Калібрувальна крива будувалася за відомими концентраціями кардіоліпіну

(Sigma-Aldrich, США): від 10-60 мкм кардіоліпіну у пробі та 20 мкм акридин оранж 10-ноніл броміду (Sigma-Aldrich, США).

Кількісне визначення вмісту нейтральних ліпідів (триацилгліцеролів, диацилгліцеролів, вільних жирних кислот) в пробах проводили за методом March і Weinstein [173]. Елюат випаровували, у пробірки додавали по 2 мл концентрованої  $\text{H}_2\text{SO}_4$  і поміщали в блоки для спалювання на 15 хвилин при  $t+200\text{ }^\circ\text{C}$ . Після охолодження в пробірки додавали по 2 мл dist.  $\text{H}_2\text{O}$ , вміст перемішували і знову охолоджували. Оптичну щільність проб вимірювали при довжині хвилі 375 нм на спектрофотометрі СФ-26.

## **2. 9 Визначення вмісту білка**

Для визначення кількості білка брали 0,1 мл лізату гепатоцитів, гомогенату печінки, серця або неокортексу. Вміст білка в пробах визначали за методом Lowry і співавторів [174].

## **2. 10 Визначення активності аланінамінотрансфераз, аспартатамінотрансфераз та лактатдегідрогеназ у сироватці крові**

Визначення загальної активності аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази та лактатдегідрогенази у сироватці крові щурів проводилось за допомогою стандартних наборів реактивів фірми «Філісіт-Діагностика» Україна.

## **2. 11 Визначення сфінгомеліназної активності в ізольованих гепатоцитах щурів**

Для визначення активності сфінгомеліназ у серцевому м'язі використовували субстрат ферменту — [N-метил- $^{14}\text{C}$ ]сфінгомелін (58 мкКи/мМ) («PerkinElmer», USA). Реакційна суміш для визначення

активності кислої сфінгомієлінази в серці містила 50 мМ ацетатного буферу (рН 5,0), 1 мМ ЕДТА, 2 мМ [N-метил- $^{14}\text{C}$ ]сфінгомієліну. Проби інкубували при  $t\ 37\ ^\circ\text{C}$  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  $\text{H}_2\text{O}$ . Суміш центрифугували протягом 5 хвилин при 3000 об/хв. Після поділу фаз аліквоти верхньої і нижньої фаз, що містили [ $^{14}\text{C}$ ]фосфорілхолін і [ $^{14}\text{C}$ ]сфінгомієлін відповідно, використовували для визначення радіоактивності за допомогою сцинтиляційного лічильника. Активність ферменту виражали в нмоль продукту або субстрату на 1 мг білка за 1 годину.

## **2. 12 Вивчення синтезу кардіоліпіну в ізольованих гепатоцитах 3-місячних щурів**

Для вивчення синтезу кардіоліпіну гепатоцити інкубували у присутності попередника синтезу ліпідів [ $^{14}\text{C}$ ]лінолевої кислоти (Amersham (Англія) (0,25 мкКі/мл середовища). Після чого проводили екстракцію ліпідів як описано в пункті 2.5 та розподіляли ліпіди за методом тонкошарової хроматографії (див. пункт 2.6). Плями кардіоліпіну зіскоблювали з хроматографічних платівок у флакони та заливали сцинтиляційної рідиною. Радіоактивність проб, що містять мічені [ $^{14}\text{C}$ ]ліпіди, визначали за допомогою лічильника радіоактивності БЕТА.

## **2. 13 Статистичний аналіз даних**

Для аналізу даних, отриманих у ході скринінгових досліджень при підборі доз і режиму введення модуляторів метаболізму сфінголіпідів, і при аналізі результатів поведінкових тестів щурів використовували непараметричні критерії Манна-Уїтні, Крускала-Уоліса, Фрідмана і

Уїлкоксона. При вивченні вікових особливостей вмісту ліпідів в різних тканинах щурів для порівняння двох груп використовували параметричний t-критерій Стюдента. З метою множинні порівнянь в роботі використовували дисперсійний аналіз (ANOVA). Відмінності між групами вважали статистично значущими при  $p \leq 0,05$ .

## 2. 14 Список використаних реактивів

В даній роботі були використані наступні реактиви: сахароза, ЕДТА і інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації х.ч. Набори для визначення загальної активності аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази та лактатдегідрогенази, отримані від «Філісіт-Діагностика» Україна. А також, HEPES, трипановий синій («Serva», Німеччина), пальмітинова кислота, бичачий сироватковий альбумін, GW4869, міріоцин, виробництва Sigma (США), D-еритро-N-стеароїлсфінгозин (Kaunas University of Technology, Литва), D-еритро-N-ацетилсфінгозин (Amersham, Англія),  $[^{14}\text{C}]\text{H}_3\text{COONa}$  (1,7 ТБк/М, Росія), D-еритро-N-пальмітоїлсфінгозин (Sigma, США), середа 199 («РАА», Австрія) середа Ігла (Інститут поліомієліту і вірусних енцефалітів, Росія), ембріональна сироватка (ООО «БіолоТ», Росія), кардіоліпін, акридин оранж 10-ноніл бромід (Sigma-Aldrich, США), золедренова кислота (Zometa, Novartis), аскорбінова кислота (Белгородський вітамінний комбінат, Росія), риб'ячий жир (АТ «Галичфарм» Україна),  $[^{14}\text{C}]\text{лінолева}$  кислота (58 mKi/mmol) Amersham (Англія), кверцетин («Merck», Німеччина), N-ацетилцистеїн (Sigma-Aldrich, Англія), препарат «Інгаміст» (ТОВ «Юрія-Фарм», Україна), іміпрамін (EGIS Pharmaceutical PLC, Будапешт, Угорщина), розчин глюкози 1 % (ЗАТ "Іфузія" Україна), доксорубицин (Pharmachemie B.V., Голландія),  $[^3\text{H}]\text{глюкоза}$  (4 МБк/М, Росія), інсулін («Індар», Україна), ЕДТА, сахароза та інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації х.ч.

## Висновки до розділу 2

В ході підготовки дисертаційної роботи були використані фізіологічні методи: спостереження за поведінкою тварин в тестах «Відкрите поле», «Темний/світлий відсік», «Перевага до розчину сахарози», «Годування в незнайомій обстановці», «Імобілізація за хвіст», «Сплеш-тест». У серії дослідів групу щурів утримували на експериментальних раціонах: високо жирової дієти або калорійно-обмеженої дієти за Маккеєм-Нікітіним. Крім того в роботі досліджували зміни кардіоліпіну під впливом етанолу та риб'ячого жиру і кверцетину на тлі етанолу в тканинах 3-місячних щурів. В роботі використовували сучасні методи клітинної біології (виділення та ізолювання гепатоцитів за методом Петренка і співавторів, виділення мітохондрій за методом Камату в модифікації Лемешко В.В., визначення цілісності клітинних мембран гепатоцитів – тест з трипановим синім, визначення лактатдегідрогенази та методів флуоресценції (визначення вмісту кардіоліпіну за методом забарвлення N-ноніл-акридин-оранжем); біохімічними методами (визначення активності сфінгомієліназ, екстракція ліпідів за методом Bligh, Dyer, визначення білка за методом Lowry, кількісне визначення ліпідів за методами Bartlett та March, Weinstein), хроматографічні (розподіл ліпідних фракцій за допомогою тонкошарової хроматографії), радіоізотопні (включення мічених попередників до ліпідів, поглинання міченої глюкози клітинами та тканинами), статистичні методи (аналіз отриманих даних).

Результати власних досліджень наведено в публікаціях [142, 148, 156, 163].



## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

#### 3. 1 Вікові особливості вмісту кардіоліпіну в функціонально різних тканинах і органах щурів

Старіння - це багатофакторний процес, під час якого фізіологічні зміни відбуваються у всіх тканинах. Старіння характеризується збільшенням ризику розвитку інфаркту міокарда, інсульту, атеросклерозу, діабету, гіпертонії та ряду інших захворювань [175, 176]. Відомо, що біохімічні особливості тканини є основою їх фізіологічної функції. Так, тканини головного мозку, які характеризуються високим рівнем вмісту і різноманітням ліпідів особливо чутливі до перебудов ліпідів [177]. Крім того старіння характеризується зменшенням кількості нейронів головного мозку та поступовим заміщенням їх гліальними елементами. Крім того, деякі дослідники вказують на уповільнення кровотоку в мозку і зменшення поглинання кисню тканинами мозку у людей похилого віку і тварин [178, 179, 180].

Печінка відіграє ключову роль у ліпідному метаболізмі та є основним місцем утворення ліпопротеїдів і ліпідів. З віком зменшуються розмір та маса печінки. Разом із тим, при старінні відмічається поступове зменшення кількості гепатоцитів та зниження в цих клітинах вмісту глікогену. При електронно-мікроскопічному дослідженні виявляється зменшення кількості мітохондрій та рибосом і збільшення лізосом.

Робота серця характеризується особливостями, пов'язаними з його функціонуванням, метаболізмом, кровопостачанням і іннервацією, що зумовлюють якісні особливості патологічних процесів, які розвиваються в ньому. Висока швидкість метаболізму ліпідів у серцевій тканині збільшує

ризик розвитку серцево-судинних захворювань при старінні. З віком відмічається збільшення відносної маси серця і площі поперечного перетину кардіоміоцитів, потовщення стінки, розширення лівого шлуночка, а також поява діастолічних дисфункцій [181, 182]. Зміни інтервалів серцевого ритму асоціюються із порушенням просторового розподілу коннексину 43 – білка, що утворює міжклітинні канали та забезпечує дифузію низькомолекулярних речовин між сусідніми клітинами і грає критичну роль в синхронізації серцевих скорочень [183]. Крім того, серце є органом з високим вмістом кардіоліпіну, що дозволяє деяким дослідникам пов'язувати вікові зміни вмісту кардіоліпіну в серці зі змінами в структурі та функціонуванні кардіоміоцитів [184].

Для детального вивчення зміни рівня кардіоліпіну у процесі онтогенезу були досліджені тканини інтактних молодих статевозрілих (3-місячних), дорослих (12-місячних), старих (24-місячних), і групи дуже старих (30-32-місячних) щурів. У нашій роботі встановлено, що у 12-місячному віці вміст кардіоліпіну в серці знижується на 22 % у порівнянні з 3-місячними щурами (Рис. 3.1 А). В подальшому онтогенезі рівень кардіоліпіну в серці продовжував знижуватися і к 24-місячному віку складав лише 45 % від такого у серці 3-місячних тварин (Рис. 3.1 А). Однак, у дуже старих щурів, 30-32-місячного віку вміст кардіоліпіну в серці не відрізнявся від рівня цього фосфоліпиду у 24-місячних тварин.

З моменту відкриття кардіоліпіну і по теперішній час багато груп дослідників вивчали цей фосфоліпід, що призвело до накопичення великої кількості експериментальних даних щодо вмісту кардіоліпіну у різних тканинах і клітинах [30-38, 185]. Так, дослідження вікових змін рівня кардіоліпіну виявило зниження вмісту цього фосфоліпиду в серці 24-місячних щурів лінії Вістар [94, 95, 148, 163, 186], 30-місячних щурів-самців лінії Фішер 344 [96] та 22-місячних щурів зі спонтанною гіпертензією та серцевої недостатністю [97] порівняно з молодими щурами відповідних ліній.

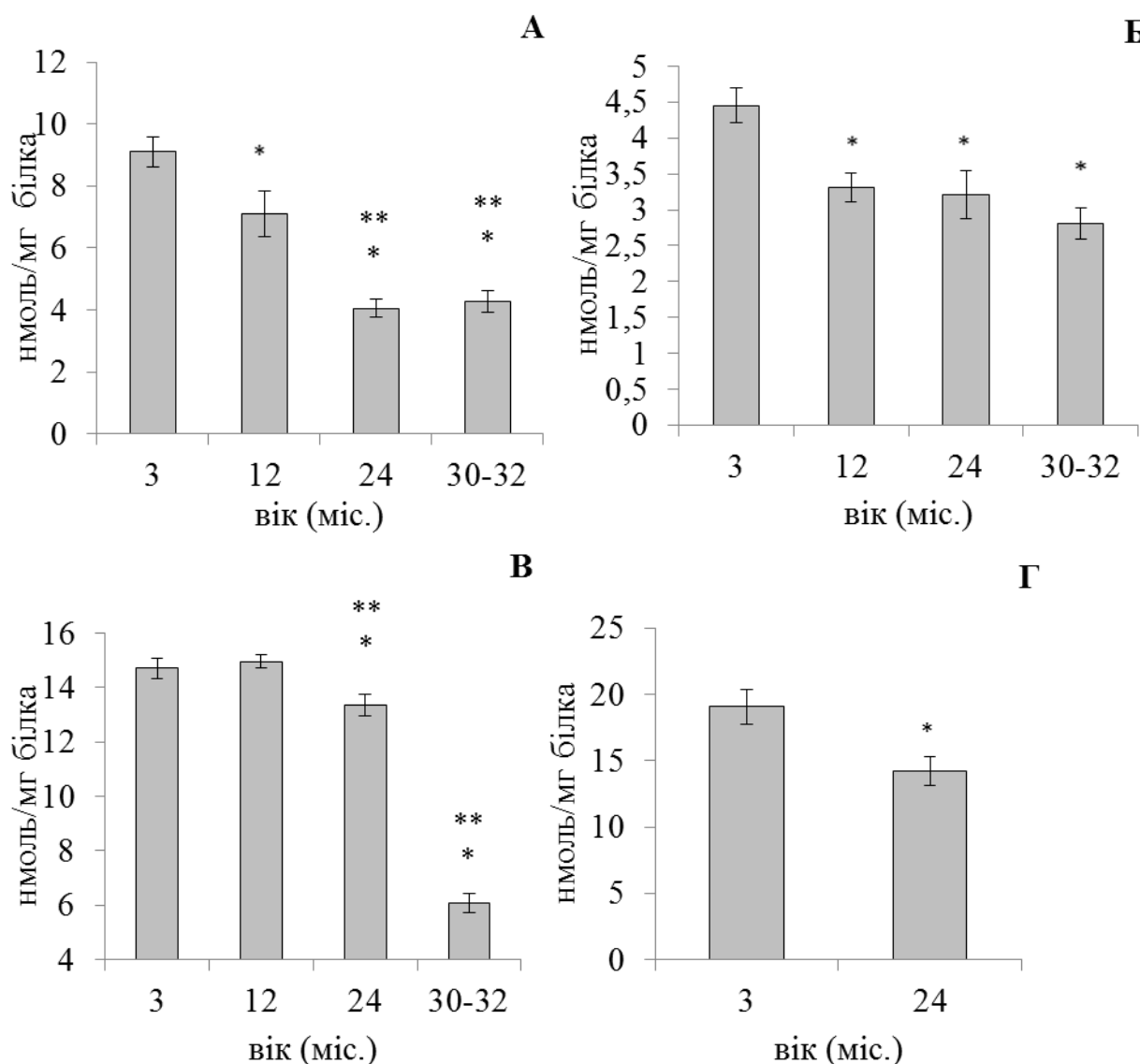


Рис. 3.1 Вікові особливості вмісту кардіоліпіну в серці (А), печінці (Б), корі мозку (В) та гіпокампі (Г) щурів лінії Вістар

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою 3-місячних щурів; \*\* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою 12-місячних щурів

Якщо у серці вміст кардіоліпіну поступово знижувався протягом життя, то в печінці щурів спостерігається інша картина (Рис. 3.1 Б). Так, у печінці щурів 12-місячного віку рівень кардіоліпіну знижується на 25 % у порівнянні з 3-місячними щурами. В подальшому онтогенезі вміст кардіоліпіну лишається на рівні близькому до такого у 12-місячних щурів (Рис. 3.1 Б). Результати отримані іншими дослідниками показали зниження

вмісту кардіоліпіну в гепатоцитах 20-28-місячних щурів лінії Фишер у порівнянні з вмістом цього ліпиду в клітинах 3-5-місячних тварин [187].

Наступним об'єктом нашого дослідження явився мозок, оскільки відомо, що розвиток багатьох нейродегенеративних захворювань щільно пов'язаний із віком. Крім того, вважається, що старіння мозку ссавців пов'язане з поступовим зниженням продуктивності окисного фосфорилування [188]. Мітохондрії виділені із гіпокампу дорослих (12-місячних) та старих 20-місячних щурів лінії Вістар характеризуються зниженням частоти переносу електронів в I (на 57–73 %) і в IV (на 33–54 %) комплексах респіраторного ланцюга, зменшенням мембранного потенціалу та збільшенням вмісту продуктів окиснення (на 66–74 %) у порівнянні з мітохондріями отриманими з гіпокампу молодих 4-місячних щурів [188, 189]. Існує багато доказів того, що мітохондріальна дисфункція та порушення дихальних комплексів пов'язані з втратою нейронів, та можуть передувати розвитку вік-асоційованих нейродегенеративних захворювань [190]. Разом із цим, при деяких нейродегенеративних захворюваннях спостерігалось падіння рівня кардіоліпіну, що передувало розвитку апоптотичної загибелі тканин головного мозку щурів [101, 102]. Дослідження зміни вмісту кардіоліпіну у мозку у процесі онтогенезу виявило, що на відміну від такого в серці та печінці, вміст кардіоліпіну в мозку 12-місячних тварин не відрізняється від рівня цього ліпиду у молодих 3-місячних щурів (Рис. 3.1 В). У старих 24-місячних щурів спостерігалось зниження вмісту кардіоліпіну у корі мозку порівняно з 3-місячними щурами (Рис. 3.1 В). Суттєве падіння вмісту кардіоліпіну в корі мозку виявлялось у 30-32-місячних щурів – на 59 % нижче, ніж рівень кардіоліпіну в корі мозку 3-місячних тварин (Рис. 3.1 В). У той же час, рівень кардіоліпіну в гіпокампі 24-місячних щурів виявився на 25 % нижчим, ніж у 3-місячних щурів (Рис. 3.1 Г).

Раніше було встановлено значне зниження активності цитохром с оксидази в мозку 24-місячних щурів (на 30 % від такого у 3-місячних щурів), що асоціюється із порушенням дихання, змінами мембранного потенціалу, та

зростанням генерації  $H_2O_2$  [191]. Крім того, у ряді досліджень, проведених Paradies та співавторами [185, 192, 193, 194], вікова залежність втрати кардіоліпіну в мітохондріях серця була тісно пов'язана зі зниженою активністю транспортера фосфату [192], транспортера пірувату [185], транспортера аденинового нуклеотиду, цитохромоксидази [193] і транспортеру карнітин-ацилкарнітину [194]. Вважається, що мітохондріальне дихання є важливим джерелом активних форм кисню та потенційним фактором функціональних змін мозку при старінні. Разом із цим, встановлено накопичення перекисних форм кардіоліпіну в мітохондріях головного мозку 24-місячних щурів [38]. Пригнічену з віком активність цитохром с оксидази у тканинах головного мозку щурів вдавалось відновити до рівня молодих тварин, шляхом додавання екзогенного кардіоліпіну, що дозволило продемонструвати суттєву роль кардіоліпіну у функціонуванні комплексів респіраторного ланцюга [38].

Мітохондрії грають критичну роль в регулюванні генерації енергії, метаболізму, сигнальній трансдукції та апоптозу. З віком відмічається зміна морфології мітохондрій. Так, в кардіоміоцитах щурів з 18-місячного віку спостерігалось набухання мітохондрій, деструкція крист і просвітлення матриксу цих органел, що дозволило авторам встановити вік появи ранніх ознак мітохондріальної дисфункції в серці щурів [195]. Багатьма дослідженнями встановлено, що морфологічні та функціональні зміни мітохондрій відбуваються внаслідок зміни їх ліпідного складу і зокрема зменшення вмісту кардіоліпіну – фосфоліпіду необхідного для підтримки структури і функції мітохондрій [31, 37].

У нашій роботі встановлено вікове зниження рівня кардіоліпіну в мітохондріях серця (на 37 %), печінки (на 54 %) та мозку (на 20 %) 24-місячних щурів лінії Вістар у порівнянні з рівнем кардіоліпіну в тканинах 3-місячних тварин (Рис. 3.2).

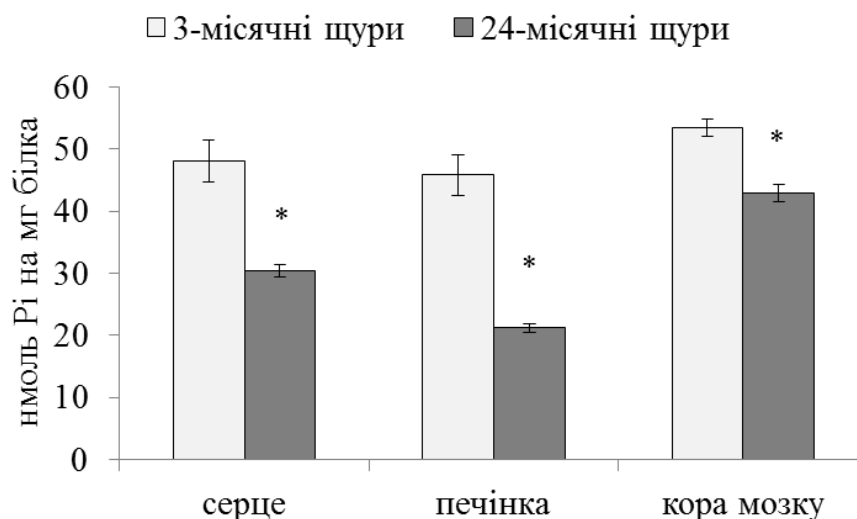


Рис. 3.2 Вікові зміни вмісту кардіоліпіну в мітохондріальній фракції мозку, печінки і серця

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою 3-місячних щурів

Таким чином, дані отримані з мітохондріальної фракції підтверджують результати дослідження цілої тканини та узгоджуються з результатами інших дослідників, які встановили зниження вмісту кардіоліпіну в мітохондріях серця (на 40 %) [103] та в мітохондріях печінки (на 50 %) [187] 26-місячних щурів лінії Фішер у порівнянні з молодими щурами цієї лінії. Крім того, дослідження мітохондрій мозку 24-місячних щурів Вістар, також виявили зниження рівня кардіоліпіну у порівнянні з групою 5-місячних щурів [191].

### 3.2 Роль церамідів у вікових змінах метаболізму кардіоліпіну в функціонально різних тканинах щурів 3- та 24-місячного віку

#### 3.2.1 Вплив дієтичних факторів та фармакологічних препаратів, що індукують накопичення церамідів у клітинах на вміст кардіоліпіну в тканинах щурів різного віку

Порушення метаболізму кардіоліпіну в клітинах відзначається при розвитку багатьох патологічних станів і асоціюється з вік-залежними

захворюваннями. Зменшення дихальної активності мітохондрій, збільшення проникності мембран, пригнічення життєздатності клітин і входження клітини в апоптоз пов'язане зі зниженням вмісту кардіоліпіну. У той же час відомо, що керамід наряду з кардіоліпіном є важливим компонентом мітохондрій, та може безпосередньо впливати на функціонування цих органел, реалізуючи апоптогенні ефекти [23]. Крім того, у численних роботах було продемонстроване накопичення керамідів у клітинах печінки та мозку з віком [10, 12, 13, 14, 15, 142]. Це дозволяє припустити, що метаболізм мітохондріальних ліпідів, і зокрема кардіоліпіну може бути пов'язаний з сигналінгом кераміду. Для встановлення взаємозв'язку між змінами вмісту кардіоліпіну та кераміду на наступному етапі роботи проведена серія дослідів у яких штучно підвищували рівень ендogenous кераміду в клітинах дослідних щурів.

В даний час вважається, що багато які сполуки можуть реалізовувати свої ефекти шляхом підвищення рівня кераміду та порушення функціонального стану мітохондрій [196, 197, 198]. Так, відомо, що протипухлинний препарат доксорубіцин, етанол, пальмитинова кислота та дієти з підвищеним вмістом насичених жирних кислот, а також екзогенне введення кераміду може сприяти підвищенню рівня ендogenous керамідів у клітинах.

Доксорубіцин – препарат, що оказує потужну цитостатичну дію, та застосовується в хіміотерапії онкологічних захворювань різного генезу. Багаточисленними дослідженнями показане, що висока кардіотоксичність доксорубіцину пов'язана з наростанням в клітинах активних форм кисню, активізацією перекісного окиснення ліпідів в міокарді та в печінці щурів, що у свою чергу підвищує проникність клітинних мембран і призводить до перевантаження клітин  $\text{Ca}^{2+}$  [199]. Збільшення продукції активних форм кисню при дії доксорубіцину, призводить до зниження внутрішньоклітинного вмісту відновленого глутатіону і зменшення окисно-відновного потенціалу, що в результаті призводить до запуску програми

апоптозу. Однак останні дослідження показали, що ефект доксорубіцину може й не залежати від окисного ушкодження. Так, дослідження впливу доксорубіцину на гепатоцити щурів показали здатність доксорубіцину стимулювати накопичення в клітинах-мішенях активного метаболіту сфінгомієліну – цераміду [13, 157, 200]. Показане, що доксорубіцин активує ферменти синтезу цераміду *de novo*: серинпальмітоїлтрансферазу та церамідсинтазу [200].

Дослідження дії доксорубіцину на організм щурів виявило, що низькі дози (3 мг/кг ваги тварини) не мають будь-яких ефектів на зовнішній вигляд тварин чи кількість їжі, що вживається щурами [201]. Однак високі дози (9 мг/кг ваги тварини) викликають значне зниження вживання корму, розвиток часткової алопеції, гіперпігментації шкіри і слизових оболонок [201]. Тривале введення високих доз доксорубіцину призводило до значного зниження маси тіла тварин, причому рівень зниження ваги залежав від дози введеного препарату [201]. В нашій роботі встановлено, що введення доксорубіцину у дозі 5 мг/кг ваги щурів протягом 4 тижнів викликає зниження ваги тварин (Рис. 3.3 А) та збільшення відносної ваги серця і печінки у порівнянні з контрольною групою (Рис. 3.3 Б і 3.3 В відповідно). Однак, обрана нами доза і термін введення препарату не призводили до погіршення зовнішнього вигляду дослідних тварин. Відсутність токсичного впливу доксорубіцину в обраних дозах підтверджується рівнями аланінамінотрансфераз ( $0,43 \pm 0,02$  мкат/л/год. у контрольних щурів та  $0,38 \pm 0,03$  мкат/л/год. у дослідних тварин) та аспартатамінотрансфераз ( $0,28 \pm 0,03$  мкат/л/год. у контрольних щурів та  $0,26 \pm 0,02$  мкат/л/год. у дослідних тварин) в сироватці крові щурів після введення доксорубіцину. Встановлено, що додавання доксорубіцину до середовища культивування гепатоцитів призводить до збільшення ендогенних церамідів у гепатоцитах щурів, а запобігання накопиченню цераміду досягалось дією специфічних інгібіторів ферментів синтезу сфінголіпідів і деградації сфінгомієліну – міріоцину, GW4869 та іміпраміну [11].



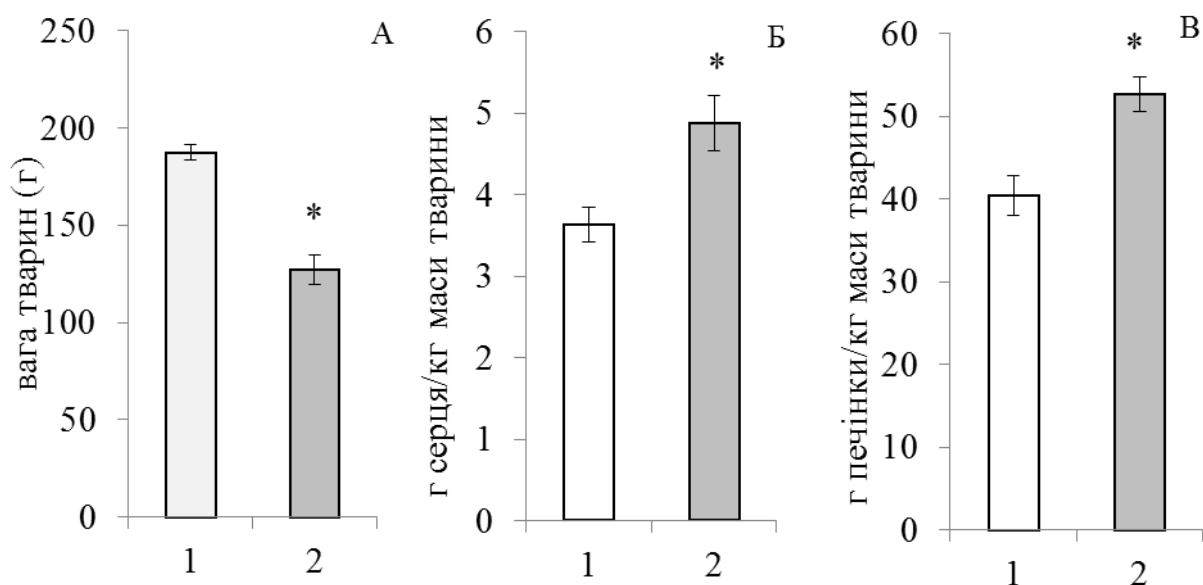


Рис. 3.3 Вплив доксорубіцину на масу тіла (А), та відносну вагу серця (Б) і печінки (В) 3-місячних щурів

Примітка. 1 – контрольні щури; 2 – щури, що отримували доксорубіцин; \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Контроль»

Враховуючи те, що накопичення в клітинах кераміду може впливати на функціонування мітохондрій на наступному етапі роботи досліджували зміни вмісту кардіоліпіну при моделюванні підвищеного рівня кераміду доксорубіцином [202, 203]. В серці і печінці щурів, що отримували ін'єкцію доксорубіцину спостерігається зниження рівня кардіоліпіну на 25 % (в печінці) і на 28 % (в серці) у порівнянні з контрольними тваринами (Рис. 3.4). Порівнюючи зміни кардіоліпіну при дії цитостатику і при природному старінні, можна відзначити, що доксорубіцин викликає зниження рівня кардіоліпіну в печінці дослідних тварин до такого в печінці інтактних 24-місячних щурів. В корі мозку піддослідних щурів зміни вмісту кардіоліпіну не спостерігалось (Рис. 3.4). Вочевидь, доксорубіцин не впливає на кору мозку в даних умовах експерименту, внаслідок його не здатності проникати крізь гематоенцефалічний бар'єр.

Раніше було встановлено, що пригнічення активності сфінгомеліназ меліпраміном або D609 перед експериментальної ішемією дозволяє знизити

ішемічне ураження серця. Так, внутрішньовенне введення D609, так саме як і меліпраміну, запобігає акумуляції цераміду і зниженню тиску в лівому шлуночку, зменшує розмір інфарктних ділянок, експресію антиапоптотичного білка Bcl-2 і запобігає загибелі кардіоміоцитів [204, 205, 206].

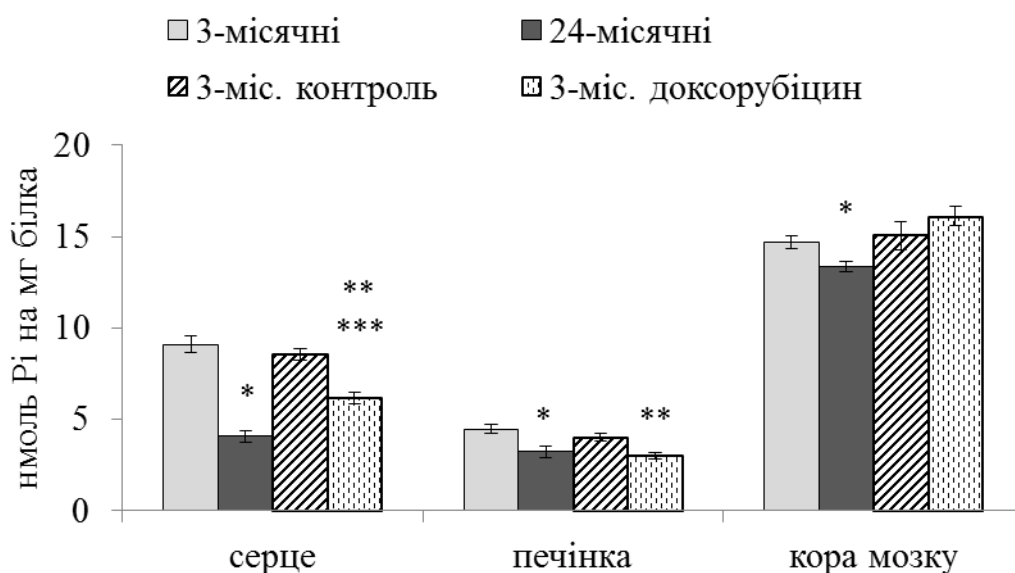


Рис. 3.4 Вміст кардіоліпіну в тканинах щурів при дії доксорубіцину

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «3-місячні»; \*\* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «3-міс. контроль»; \*\*\* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «24-місячні»

Враховуючи ці данні, а також відомий кардіотоксичний вплив доксорубіцину [207, 208] можна припустити, що цей препарат опосередковує свої ефекти у серці завдяки збільшенню рівня цераміду, який у свою чергу порушує обмін кардіоліпіну. Щоб перевірити це припущення, на наступному етапі нашої роботи ми моделювали підвищений вміст цераміду в гепатоцитах 3-місячних щурів за допомогою додавання доксорубіцину та інгібіторів метаболізму цераміду (іміпраміну, GW4869 та міріоцину) на тлі доксорубіцину до середовища інкубації клітин. Попередніми дослідженнями було встановлено, що введенням в середовище інкубації гепатоцитів 24-місячних щурів специфічних інгібіторів різних ланок метаболізму

сфінголіпідів можна запобігти накопиченню цераміду в клітинах [10, 11]. Так, показано, що введення до середовища інкубації клітин інгібітору серинпальмітоїлтрансферази – міріоцину – запобігало накопиченню ендогенного цераміду, та нормалізувало вміст цього ліпиду як в гепатоцитах старих щурів, так і в клітинах 3-місячних щурів, що піддавалися дії екзогенного цераміду [10, 13]. В нашій роботі встановлено зниження вмісту кардіоліпіну та підвищення рівня фосфатидної кислоти при дії доксорубіцину на гепатоцити щурів у порівнянні з контролем (Табл. 3.1). Накопичення фосфатидної кислоти, яка є попередником синтезу фосфоліпідів, може свідчити про пригнічення шляхів біосинтезу ліпідів, і зокрема кардіоліпіну. В той же час, введення до середовища культивування гепатоцитів міріоцину на тлі доксорубіцину запобігало падінню рівня кардіоліпіну і накопиченню фосфатидної кислоти (Табл. 3.1).

Таблиця 3.1

**Вміст кардіоліпіну і фосфатидної кислоти в гепатоцитах при дії доксорубіцину та інгібіторів на тлі доксорубіцину. Данні представлені в нмоль/мг білка**

	кардіоліпін	фосфатидна кислота
Контроль	7,21±0,31	1,64±0,25
Доксорубіцин	5,59±0,22*	3,89±0,31*
Доксорубіцин+Іміпрамін	5,91±0,25*	2,79±0,35*
Доксорубіцин+GW4869	5,77±0,16*	3,51±0,19*
Доксорубіцин+Міріоцин	6,67±0,25#	2,22±0,39#

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Контроль»; # –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Доксорубіцин»

Відомо, що міріоцин зв'язує активний центр серинпальмітоїлтрансферази, що призводить до порушення синтезу сфінголіпідів *de novo* [209]. Крім того запобігти накопиченню цераміду

можна шляхом пригнічення активності нейтральних та кислих груп сфінгомієліназ, які розщеплюють сфінгомієлін з утворенням кераміду. Одним з препаратів, що пригнічує активність сфінгомієліназ є іміпрамін. Іміпрамін – трициклічний антидепресант, що блокує поглинання адренергічних нейромедіаторів в центральній нервовій системі, завдяки чому широко використовується при лікуванні важких депресій, сприяє покращенню настрою, появі бадьорості, зменшенню рухової загальмованості. Відомо, що іміпрамін ефективно пригнічує активність кислої сфінгомієлінази шляхом порушення її зв'язку з негативно зарядженими ліпідами лізосомальних мембран, після чого цей фермент піддається протеолізу [145, 160]. Інший найчастіше застосовуваний фармакологічний інструмент для вивчення ролі сфінгомієліназ – GW4869 – селективний інгібітор нейтральної сфінгомієлінази, який повністю пригнічує початкове накопичення кераміду, але не впливає на інші ферменти метаболізму сфінголіпідів [159, 210]. Однак, в нашій роботі використання іміпраміну та GW4869 на тлі доксорубіцину не впливали на метаболізм кардіоліпіну і фосфатидної кислоти (Табл. 3.1). Таким чином, з усіх досліджених модуляторів обміну сфінголіпідів тільки міріюцин нівелював ефекти доксорубіцину та відновлював рівні кардіоліпіну та фосфатидної кислоти до таких у контролі. Оскільки обрані інгібітори впливають на різні ланки метаболізму кераміду, можна припустити, що в даних умовах експерименту ефекти доксорубіцину на вміст кардіоліпіну опосередковані саме збільшенням знов синтезованого кераміду. Тому пригнічення шляхів синтезу кераміду *de novo* міріюцином призводило до нормалізації вмісту кардіоліпіну та фосфатидної кислоти в гепатоцитах 3-місячних щурів.

Відомо, що дієтичні фактори можуть впливати на рівень кардіоліпіну і моделювати його вміст в мітохондріях. Різні жирні кислоти по-різному метаболізуються і тому можуть надавати неоднакові фізіологічні ефекти [211]. В експериментах, при дії різних дієтичних факторів у щурів, було виявлено, що модифікація фосфоліпідів мітохондрій збагаченням раціону

риб'ячим жиром запобігає зниженню кардіоліпіну і респіраторної активності мітохондрій з віком [30]. Цікаво, що при дієті, що збільшує вміст кардіоліпіну, спостерігалася підвищена толерантність молодих щурів до експериментальної ішемії та реперфузії [32]. Так, додавання сафлорової олії (багатої на лінолеву кислоту) до харчового раціону 21-місячних щурів зі спонтанною гіпертензією протягом 4-х тижнів запобігало зменшенню рівня кардіоліпіну і мітохондріальної функції за умов моделювання ішемії та реперфузії, та дозволило авторам припустити, що сафлорова олія може використовуватись у якості допоміжної терапії при серцевій недостатності [212]. Відомо, що накопичення насичених жирних кислот в таких тканинах, як серцева, ниркова, тканини головного мозку, може призводити до ліпотоксичності [213]. Ostrander D. B. і співавторами було показано, що насичена жирна кислота – пальмітат індукує апоптоз в неонатальних кардіоміоцитах у щурів і знижує рівень кардіоліпіну [80]. Hardy S. і співробітниками було продемонстроване, що пальмітат викликає раннє посилення обміну кардіоліпіну в культурі клітин раку молочної залози і подальше зниження рівня цього мітохондріального фосфоліпіду [214]. Однак механізм, яким пальмітат індукує загибель клітини лишається не до кінця зрозумілим. С одного боку передбачається, що наявність амфіфільних молекул може послаблювати біосинтез кардіоліпіну, що і спостерігається при підвищених концентраціях довголанцюгових жирних кислот [29]. Відзначається також, що пальмітинова кислота знижує мембранний потенціал мітохондрій і викликає апоптоз в культурі клітин раку молочної залози людини MDA-MB-231 [214]. Вважається, що заміна ненасичених жирних кислот у складі кардіоліпіну на насичені (наприклад, пальмітинову) призводить до зменшення вмісту кардіоліпіну, і як наслідок до апоптозу. Так, індукція апоптозу насиченими жирними кислотами спостерігалася в кардіоміоцитах [215] і астроцитах [216].

З іншого боку, деякі дослідники припускають, що надлишок пальмітату індукує клітинну загибель шляхом збільшення внутрішньоклітинної

концентрації керамідів [217, 218]. У зв'язку з цим, наступним етапом нашої роботи стало моделювання підвищення ендогенних керамідів у клітинах і тканинах молодих щурів шляхом збільшення калорійності харчового раціону насиченими жирними кислотами яловичого жиру [219, 220, 221]. Відомо, що яловичий жир являє собою високотвердий жир, який містить 65 % насичених жирних кислот (переважно пальмітинову кислоту).

У цій роботі встановлено підвищення вмісту вільних жирних кислот у сироватці та в клітинах печінки щурів, які утримувались на насиченому пальмітинової кислотою раціоні (Рис. 3.5).

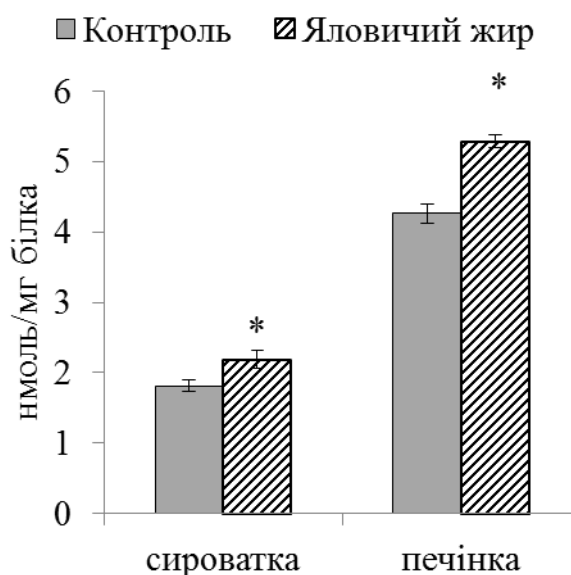


Рис. 3.5 Вміст вільних жирних кислот в сироватці і печінці щурів 3-місячного віку, що отримували високожирову дієту

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Контроль»

Попередніми дослідженнями встановлено, що утримування тварин на харчовому раціоні, збагаченому насиченими жирами яловичого жиру, супроводжується збільшенням рівня вільних жирних кислот та знов синтезованих керамідів у печінці, м'язах і мозку 24-місячних щурів у порівнянні з контрольними тваринами цього ж віку [222]. Церамід і ацилкарнітин є медіаторами дисфункції мітохондрій, що пов'язана з розвитком інсулінорезистентності у людей при ожирінні [223, 224].

Відомо, що сфінголіпіди є не тільки ключовими медіаторами відповіді клітини на стрес але і впливають на деякі процеси в мітохондріях. Так, Novgorodov і співавтори [223, 224] показали, що при діабеті збільшується рівень дигідроцерамідів у мітохондріях серця і припустили, що мітохондріальна нейтральна церамідаза регулює рівень цераміду в мітохондріях при діабеті. Аналіз вмісту гліцерофосфоліпідів в тканинах щурів, які отримували дієту, збагачену насиченими жирними кислотами, виявив зниження вмісту кардіоліпіну на 28 % в серці, і на 27 % в печінці щодо щурів, яких утримували на стандартному раціоні (Рис. 3.6 А). В умовах надмірного надходження в організм вільних жирних кислот активуються шляхи їх метаболізму, такі як синтез цераміду *de novo*. Насичені жирні кислоти – пальмітинова і стеаринова є основними попередниками синтезу цераміду і через нього опосередковують свої апоптогенні ефекти в клітинах [225].

Синтез цераміду *de novo* починається з реакції конденсації пальмітоїл-СоА і серину, в результаті чого утворюється 3-кетосфінганін, який в результаті декількох послідовних реакцій перетворюється в церамід. В той же час данні літератури свідчать про те, що збільшення концентрації довголанцюгових жирних кислот у серці приводить до зниженню вмісту кардіоліпіну [29]. Беручи до уваги ці данні, можна припустити, що порушення синтезу кардіоліпіну в умовах перевантаження тканин насиченими жирними кислотами може відбуватися внаслідок накопичення цераміду та розвитку дисфункції мітохондрії.

Фосфатидна кислота займає центральне місце в обміні фосфоліпідів в різних тканинах і клітинах. Додавання пальмітинової кислоти до дієти експериментальних тварин викликає підвищення вмісту фосфатидної кислоти в печінці (на 142 %) і в серці (на 35 %) у порівнянні з контрольними тваринами (Рис. 3.6 Б). Збільшення маси фосфатидної кислоти в клітинах може бути результатом як посилення її синтезу *de novo*, так і пригнічення її використання в синтезі фосфоліпідів.

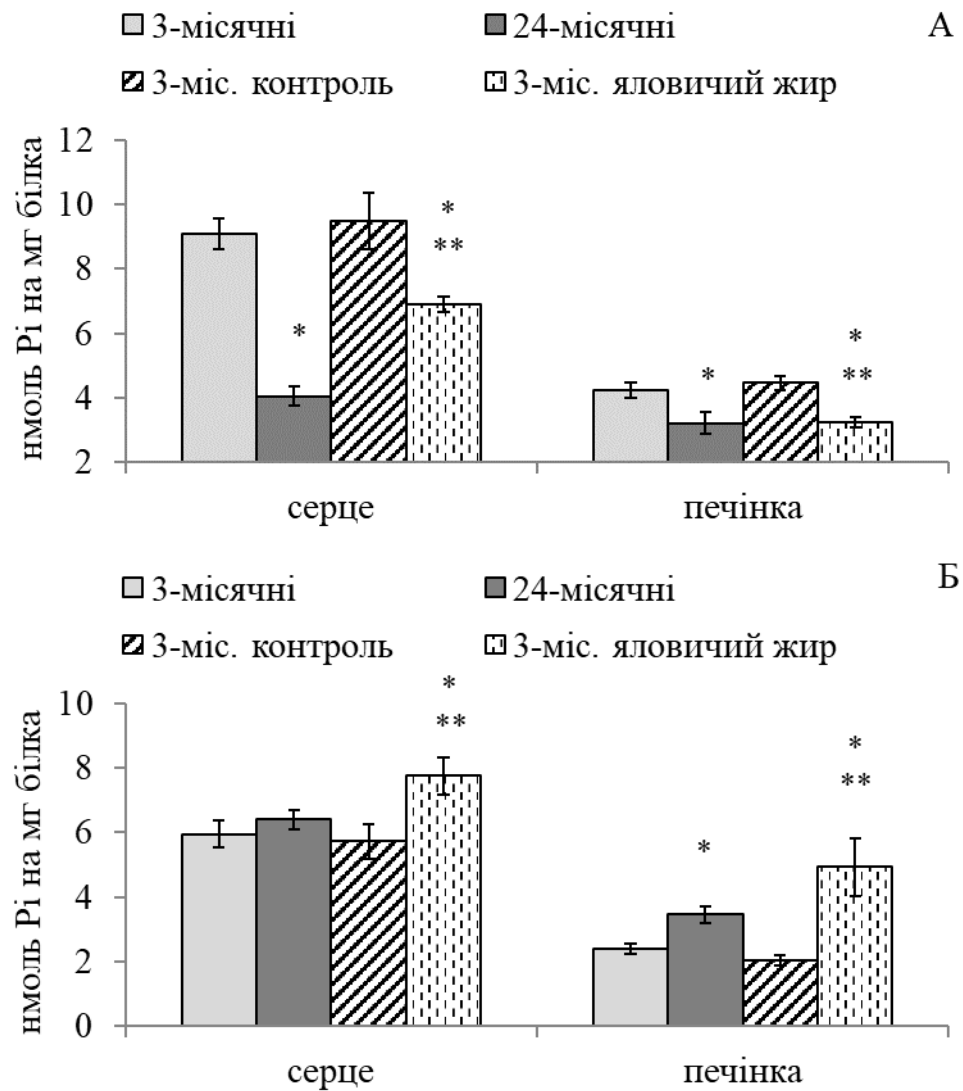


Рис. 3.6 Вплив насичених жирів дієти на вміст кардіоліпіну (А) та фосфатидної кислоти (Б) в різних тканинах 3-місячних щурів

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «3-місячні»; \*\* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «3-міс. контроль»

Таким чином, отримані у цій роботі данні свідчать про те, що збільшення вмісту насичених жирів в дієті викликає глибокі зміни ліпідного обміну. Насичені жирні кислоти дієти опосередковують свої ефекти шляхом збільшення вмісту вільних жирних кислот у сироватці і клітинах печінки, а зниження вмісту кардіоліпіну і збільшення рівня фосфатидної кислоти при дії аліментарних жирів може бути обумовлено змінами обміну сфінголіпідів і



накопиченням продукту конденсації пальмітинової кислоти та серину – цераміду у вивчених тканинах.

Деякі дослідники припускають, що надлишок пальмітату викликає загибель клітин шляхом збільшення внутрішньоклітинної концентрації церамідів [217, 218], тому на наступному етапі цього дослідження ми вивчали вплив пальмітинової кислоти на вміст кардіоліпіну і фосфатидної кислоти в ізольованих гепатоцитах 3-місячних щурів. Встановлено, що після інкубації клітин протягом 3 годин з екзогенної пальмітинової кислотою спостерігається зниження кількості гепатоцитів, як відносно контролю, так і в порівнянні з гепатоцитами, які інкубували протягом 1 години з пальмітинової кислотою (Рис. 3.7 А). Крім того, через 3 години після додавання пальмітинової кислоти спостерігалось зниження життєздатності гепатоцитів у порівнянні з клітинами печінки в контролі (Рис. 3.7 Б).

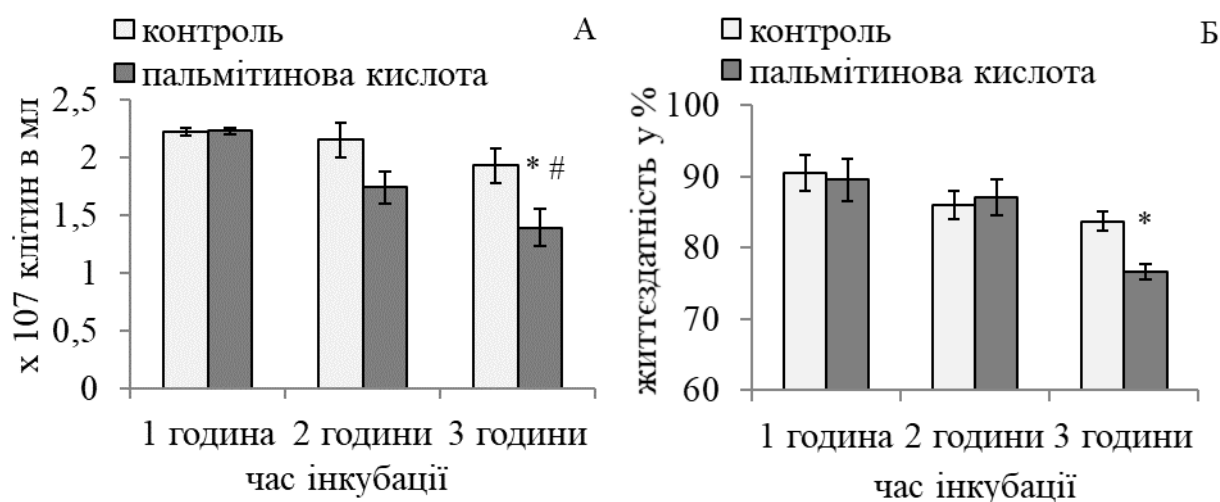


Рис. 3.7 Вплив пальмітинової кислоти на кількість гепатоцитів 3-місячних щурів (А) та їх життєздатність (Б)

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Контроль»; # –  $p < 0,05$  у порівнянні з 1-годиною інкубації

Таким чином, додавання екзогенної пальмітинової кислоти до середовища культивування гепатоцитів 3-місячних щурів призводило до зниження кількості гепатоцитів і їх життєздатності зі збільшенням часу

інкубації. Відомо, що екзогенно додані насичені жирні кислоти знижують життєздатність і індукують апоптоз в кардіоміоцитах [215, 226], астроцитах [216], гепатоцитах [227] та в культурі клітин раку молочної залози людини MDA-MB-231 [214].

Нашими дослідженнями показано, що дія пальмітинової кислоти на гепатоцити 3-місячних щурів призводила до зниження вмісту кардіоліпіну щодо контролю, причому цей ефект посилювався зі збільшенням часу інкубації (Табл. 3. 2).

*Таблиця 3.2*

**Вплив пальмітинової кислоти на вміст кардіоліпіну в гепатоцитах  
3-місячних щурів**

Час інкубації (години)	Контроль	Пальмітинова кислота
1	7,58±1,20	6,63±1,18
2	7,56±1,11	2,40±0,59 * #
3	6,17±1,09	1,14±0,42 * #

Примітка. \*–  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Контроль»; # –  $p < 0,05$  у порівнянні з 1-годиною інкубації. Данні представлені у % від загальних фосфоліпідів

Таким чином, зміна вмісту кардіоліпіну відбувається після інкубації з пальмітиновою кислотою протягом 2 годин, коли ще не спостерігається зниження життєздатності гепатоцитів і їх кількості. Враховуючи те, що кардіоліпін необхідний клітині для підтримки її функціонального стану, зниження вмісту цього ліпиду в гепатоцитах при дії пальмітинової кислоти може передувати зниженню життєздатності клітин. Поряд з дослідженням вмісту кардіоліпіну в нашому експерименті ми аналізували зміни вмісту фосфатидної кислоти в гепатоцитах щурів [228, 229]. Встановлено, що пальмітинова кислота призводила до суттєвого зростання відносного вмісту фосфатидної кислоти протягом першої години інкубації клітин у порівнянні з контролем (Табл. 3.3).

Таблиця 3.3

**Вплив пальмітинової кислоти на вміст фосфатидної кислоти в  
гепатоцитах 3-місячних щурів**

Час інкубації (години)	Контроль	Пальмітинова кислота
1	3,76±0,81	6,98±0,80 *
2	3,89±0,96	8,32±0,79 *
3	3,60±1,18	9,07±0,75 *

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Контроль». Данні представлені у % від загальних фосфоліпідів

Накопичення фосфатидної кислоти, індуковане пальмітатом на тлі зниження вмісту кардіоліпіну в клітинах, може свідчити про гальмування в даних умовах експерименту синтезу останнього. Причому, зростання вмісту фосфатидної кислоти спостерігається після 1 години інкубації клітин з пальмітиновою кислотою, коли зниження рівня кардіоліпіну ще не значне. Таким чином, дослідження залежності впливу пальмітинової кислоти на вміст кардіоліпіну і фосфатидної кислоти в гепатоцитах від часу показало, що зниженню вмісту кардіоліпіну передуює збільшення його джерела – фосфатидної кислоти. У той же час, падіння рівня кардіоліпіну в гепатоцитах при дії пальмітинової кислоти передуює зниженню кількості гепатоцитів і їх життєздатності. Індуковані пальмітатом зміни вмісту кардіоліпіну і фосфатидної кислоти в гепатоцитах щурів можна інтерпретувати як ранні зміни в клітинах, що призводять в остаточному підсумку до зниження їх життєздатності. Отримані дані дозволяють припустити, що індуковане пальмітатом накопичення в клітинах цераміду може призводити до зниження життєздатності клітин, впливаючи на метаболізм кардіоліпіну.

В даний час, одним з провідних підходів у вивченні вікових змін метаболізму лабораторних тварин є калорійно обмежена дієта [230, 231]. Показано, що обмеження калорійності харчового раціону істотно впливає на розвиток вікової патології, знижуючи частоту виникнення діабету,

нейродегенеративних та серцево-судинних захворювань [232]. Попередніми дослідженнями було встановлено, що утримання щурів на калорійно-обмеженому раціоні призводило до збільшення вмісту фосфатидилхоліну в гіпокампі та сфінгомієліну в неокортексі [233]. Крім того, зміни у складі ліпідів мозку щурів, які отримували калорійно-обмежену дієту, корелювали зі значним поліпшенням умовно-рефлекторної діяльності, когнітивних функцій та поведінкових реакцій при старінні [234].

Припускається, що калорійно обмежена дієта впливає на функціональний стан мітохондрій знижуючи окисне пошкодження, активацію апоптозу і вміст про-апоптотичних білків Bcl-XS/Bcl-XL, а також попереджає транслокацію Вах в мітохондріях і вивільнення цитохрому с до цитозолу [235, 236]. З іншого боку ефекти калорійно обмеженої дієти можуть реалізовуватися шляхом зміни метаболізму сфінголіпідів, знижуючи рівень цераміду в нирках мишей [237] і мозку щурів [233]. Враховуючи можливість модуляції підвищеного з віком вмісту цераміду і його метаболітів обмеженням калорійності харчового раціону [233, 237] метою нашої подальшої роботи явилось вивчення вмісту кардіоліпіну та фосфатидної кислоти в різних тканинах щурів з віком та при тривалій дії калорійно обмеженої дієти [148].

Накопичення цераміду в плазматичній мембрані при старінні може посилювати сигнал смерті шляхом кластеризації рецепторів в багатих на церамід ділянках або впливати на зміну співвідношення про- та антиапоптотичних білків сімейства Bcl-2 на зовнішній мембрані мітохондрій [5, 8]. Крім того церамід пригнічує дихальну активність респіраторного ланцюга і регулює проникність мітохондріальної пори і зовнішньої мембрани мітохондрій для цитохрому с, діючи самостійно або разом з білком Вах [5, 8]. У той же час, зниження продукції АТФ і активності електрон-транспортного ланцюга мітохондрій, як правило, характеризується зниженням рівня кардіоліпіну – фосфоліпиду, розташованого виключно на внутрішній мембрані мітохондрій і приймаючого участь у стабілізації мембран та

біоенергетиці цих органел [30]. Встановлене в даній роботі зниження вмісту кардіоліпіну і фосфатидної кислоти у серці, печінці та мозку 3-місячних щурів, з 1-місячного віку переведених на калорійно обмежену дієту у порівнянні з інтактними 3-місячними тваринами (Рис. 3.8) може спостерігатися внаслідок уповільнення метаболічних процесів і адаптації організму до обмеження калорійності харчового раціону. Слід зазначити, що рівень кардіоліпіну в серці і печінці старих щурів, яких утримували на калорійно обмеженій дієті відповідав такому у інтактних молодих щурів, тоді як в тканинах старих щурів, які отримували стандартну дієту, спостерігалось значне зниження вмісту кардіоліпіну (Рис. 3.8 А та 3.8 Б). У мозку щурів, яких утримували на калорійно-обмеженому раціоні спостерігалось зниження вмісту кардіоліпіну у 3-місячному віці, однак цей рівень в подальшому не змінювався протягом всього життя дослідних тварин (Рис. 3.8 В). В той же час, в мозку 24-місячних щурів, що отримували стандартну дієту рівень кардіоліпіну був значно нижчий ніж у 3-місячних тварин (Рис. 3.8 В).

Відомо, що основною причиною зниження кардіоліпіну є підсилення його деградації під дією фосфоліпаз, пригнічення синтезу *de novo* в результаті порушення роботи ферментів, що беруть участь у біосинтезі кардіоліпіну або зниження біодоступності прекурсорів кардіоліпіну. Водночас, вікове збільшення рівня кераміду може безпосередньо впливати на вміст кардіоліпіну, модулюючи активність фосфатидил-гліцерофосфат синтази, яка є ключовим ферментом в синтезі кардіоліпіну [238] або підвищуючи активність фосфоліпази А2 і продукцію активних форм кисню, які посилюють деградацію кардіоліпіну. Таким чином, можна припустити, що спостережуване зниження вмісту кардіоліпіну в серці, печінці і мозку старих тварин може бути опосередковано зростанням рівня кераміду в цих тканинах, тоді як калорійно обмежена дієта попереджає накопичення кераміду в серці і печінці щурів з віком і збільшує вміст кардіоліпіну до рівня молодих інтактних тварин.

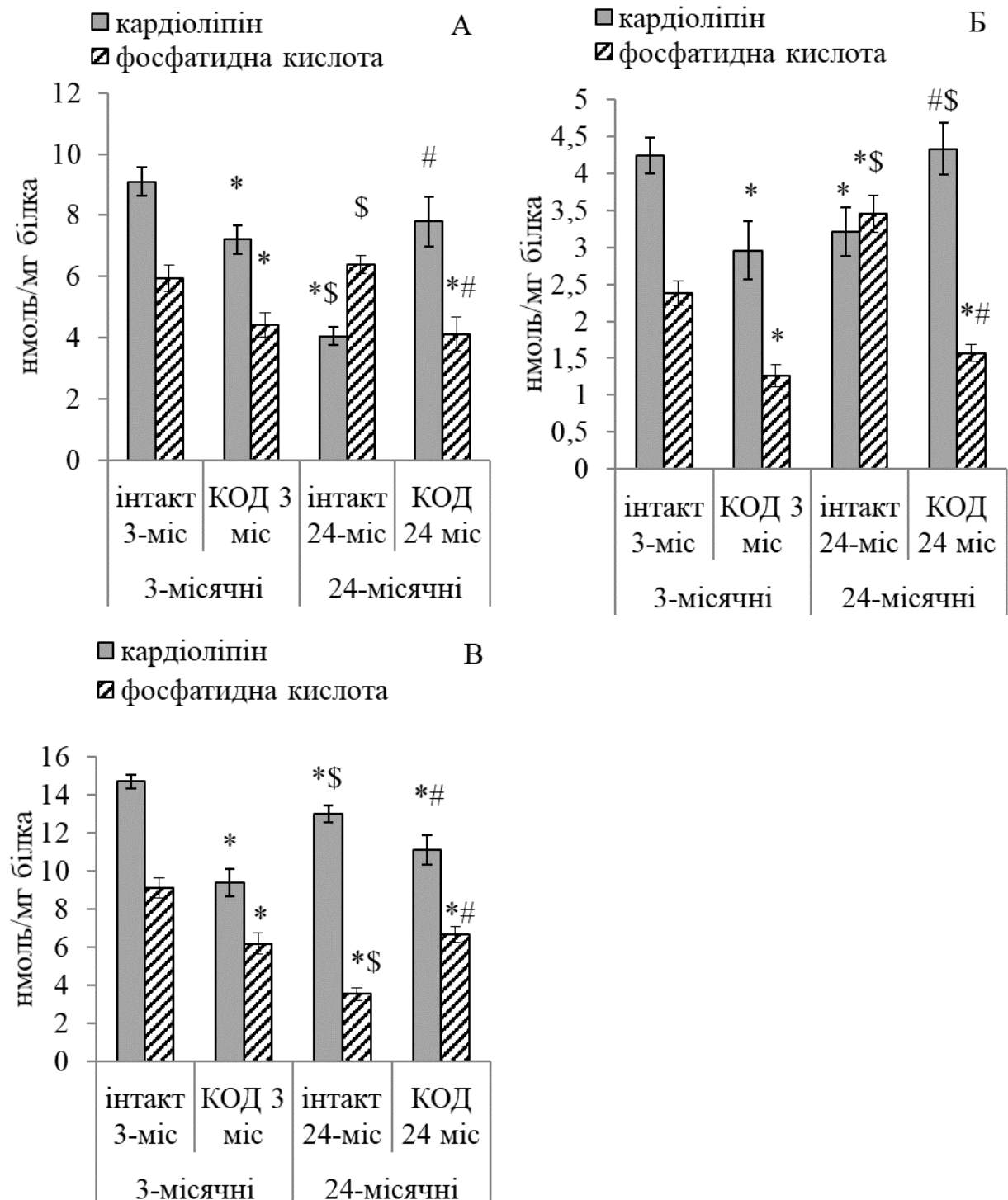


Рис. 3.8 Вплив калорійно-обмеженої дієти на вміст кардіоліпіну і фосфатидної кислоти у серці (А), печінці (Б) та корі мозку (В) 3- і 24-місячних щурів

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з інтактними 3-місячними щурами; # –  $p < 0,05$  у порівнянні з інтактними 24-місячними щурами; \$ –  $p < 0,05$  у порівнянні з 3-місячними щурами, які отримували калорійно обмежену дієту

Відомо, що фосфатидна кислота модулює активність деяких ферментів, таких як фосфоліпаза С, протеїнкінази, АМФ-циклічна фосфодіестераза, білок Ras, протеїн-тирозин фосфатаза 1 [239]. Відмічають, що фосфатидна кислота і церамід здійснюють протилежні ефекти на такі процеси в клітинах як проліферація, активація протеїнкінази С, активація NADPH оксидази і активність протеїнфосфатази 1 [240]. В нашій роботі фосфатидна кислота, яка є прекурсором у синтезі фосфоліпідів і кардіоліпіну, накопичувалась в печінці і знижувалась у мозку старих 24-місячних щурів, які отримували їжу *ad libitum* (Рис. 3.8 Б та 3.8 В). Відомо, що фосфоліпіди, утворюються розгалуженим біосинтетичним шляхом [31], що починається з фосфатидної кислоти і збільшення вмісту фосфатидної кислоти в печінці при старінні може свідчити про пригнічення її використання в синтезі фосфоліпідів. Крім того, пул фосфатидної кислоти в клітині залежить від активності фосфоліпази Д, яка піддає гідролізу такі фосфоліпіди як фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін, фосфатидилінозитол, або діацилгліцеролкіназу яка фосфорилує діацилгліцерол. Водночас, деякими дослідниками відзначається вікове зниження активності фосфоліпази Д у корі головного мозку щурів [15], що в свою чергу може викликати зниження вмісту фосфатидної кислоти в цьому органі. Калорійно обмежена дієта викликала зниження вмісту фосфатидної кислоти у всіх вивчених тканинах 3-місячних щурів і зберігала рівень цього ліпиду незмінним до 24-місячного віку (Рис. 3.8). Збереження низького рівня фосфатидної кислоти з віком у тварин на калорійно обмеженій дієті супроводжується зниженим вмістом решти вивчених ліпідів і може свідчити про уповільнення метаболічної активності в вивчених тканинах старих щурів, які отримували калорійно обмежену дієту.

Відомо, що печінка відіграє ключову роль в ліпідному метаболізмі і є основним місцем утворення ліпідів і ліпопротеїдів. У зв'язку з цим саме в печінці тварин, що отримували калорійно обмежену дієту протягом 24-місячного віку, спостерігалось відновлення вмісту кардіоліпіну до рівня інтактних 3-місячних щурів. При цьому у серці і мозку старих щурів

калорійно обмежена дієта також запобігала зниженню рівня кардіоліпіну, але зберігаючи вміст цих ліпідів, на рівні молодих щурів, які отримували калорійно обмежену дієту. Враховуючи, те, що церамід робить значний вплив на метаболізм кардіоліпіну і фосфатидної кислоти [238], можна припустити, що калорійно обмежена дієта перешкоджаючи накопиченню цераміду в клітинах різних органів з віком сприяє відновленню вмісту мітохондріального ліпиду кардіоліпіну і таким чином нівелює суттєві вікові зміни рівня даного фосфоліпиду, що у свою чергу може бути важливою причиною відновлення функцій мітохондрій в старості [31] та поліпшення когнітивних здібностей старих щурів [233, 234].

Попередніми дослідженнями встановлено, що введення етанолу 3-місячним щурам призводить до збільшення вмісту цераміду, зменшенню сфінгомієліну та порушує метаболізм фосфоліпідів у тканинах 3-місячних щурів, викликаючи схожі на вікові зміни ліпідного обміну [51]. Відомо, що етанол – біологічно високоактивна речовина, споживання якої приводить до різноманітних структурних та метаболічних порушень в клітинах [241]. Під впливом алкоголю і прозапальних медіаторів (таких як TNF- альфа і оксид азоту) в мітохондріях відбувається роз'єднання процесів окислення і фосфорилування, внаслідок чого значно зростає утворення активних форм кисню. Передбачається, що індукція оксидативного стресу і генерація цитокінів при дії етанолу є результатом накопичення цераміду в клітині внаслідок посилення синтезу *de novo* і активації сфінгомієліназ. Встановлено, що цераміди, попередньо синтезовані в ендоплазматичному ретикулумі можуть проникати в мітохондрії крізь мембранні контакти і збільшувати проникність мембран для цитохрому с і аденілаткінази [23]. У свою чергу, кардіоліпін також може впливати на метаболізм цераміду, змінюючи активність ключових ферментів метаболізму цераміду – церамідази та церамідкінази [242, 243, 244].

Цераміди також здатні посилювати генерацію активних форм кисню шляхом пригнічення III комплексу респіраторного ланцюга [245]. Шкідливу



дію активних форм кисню можна знизити шляхом додавання в дієту флаваноїда кверцетина або n-3 поліненасичених жирних кислот риб'ячого жиру, які впливають на вільно-радикальні процеси і проявляють мембраностабілізуючу дію [246, 247]. Показано, що додавання n-3 поліненасичених жирних кислот до раціону тварин протягом 4 тижнів приводить до зміни жирнокислотного складу фосфоліпідів мембран кардіоміоцитів у бік збільшення їхньої ненасиченості і поряд з кверцетином запобігає зниженню активності ферментів антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази і каталази, в умовах ішемії - реперфузії [248]. Крім того, було показано, що додавання до харчового раціону флавоноїдів [47] і поліненасичених жирних кислот [9] призводить до нормалізації вмісту цераміду в умовах вікового та експериментального порушення [47, 48]. Так, раніше, було показано, що додавання до раціону n-3 поліненасичених жирних кислот риб'ячого жиру знижує синтез і накопичення цераміду і нормалізує рівень сфінгомієліну, фосфатидилсерину та фосфатидилетаноламіну в мозку щурів, які отримували етанол [9]. Вважається, що модулюючи ефекти дієти, збагаченої поліненасиченими жирними кислотами риб'ячого жиру пов'язаний зі здатністю цих речовин вбудовуватися у фосфоліпіди та змінювати властивості мембран, а також їхніми антиоксидантними й протизапальними якостями [47, 48]. Корекція вмісту цераміду 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 [47, 48].

Враховуючи можливість моделювання рівня цераміду етанолом, поліненасиченими жирними кислотами риб'ячого жиру та кверцетином [9, 47, 48] в даній роботі вивчали вплив поліненасичених жирних кислот риб'ячого жиру та кверцетину на вміст кардіоліпіну в печінці та серці молодих щурів в умовах короткострокової дії етанолу [156, 249, 250]. Встановлено, що вміст кардіоліпіну в серці тварин, яким вводили етанол

знижувався на 30 %, а в печінці алкоголізованих щурів знижувався на 38 % порівняно з щурами контрольної групи (Рис. 3.9). В той же час, введення етанолу піддослідним тваринам супроводжувалось зростанням рівня фосфатидної кислоти у серці (на 43 %) та в печінці (на 74 %) відносно контрольних тварин, які отримували воду.

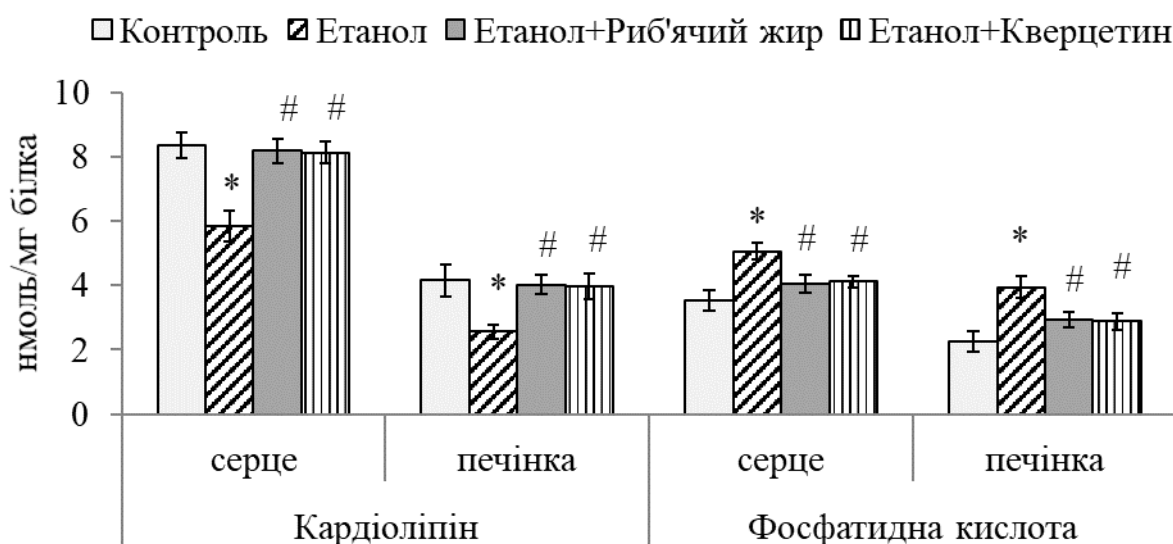


Рис. 3.9 Ефект етанолу, риб'ячого жиру і кверцетину на вміст кардіоліпіну та фосфатидної кислоти в тканинах 3-місячних щурів

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Контроль»; # –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Етанол»

Отримані дані дозволяють припустити, що зміна метаболізму компонентів сфінгомієлінового циклу в клітинах печінки і серця при дії етанолу супроводжувалася зниженням вмісту кардіоліпіну і накопиченням фосфатидної кислоти. Введення до раціону  $n-3$  поліненасичених жирних кислот риб'ячого жиру сприяло відновленню зниженого дією етанолу рівня кардіоліпіну на 29 % в серці та на 36 % в печінці піддослідних тварин. Крім того, додавання до раціону  $n-3$  поліненасичених жирних кислот риб'ячого жиру на тлі дії етанолу призводило до зниження вмісту фосфатидної кислоти у серці (на 24 %) та печінці (на 34 %) відносно рівня щурів, що отримували етанол на тлі стандартного раціону (Рис. 3.9). Ефекти кверцетину на тлі

етанолу були аналогічними дії n-3 поліненасичених жирних кислот риб'ячого жиру та сприяли зростанню рівня кардіоліпіну як в серці (на 28 %), так і в печінці (на 35 %) у порівнянні з групою тварин, що отримували етанол. Разом із цим під дією кверцетина на тлі етанолу спостерігалось зниження вмісту фосфатидної кислоти в серці (на 23 %) та печінці (на 37 %) у порівнянні з таким у тканинах алкоголізованих тварин (Рис. 3.9).

Накопичення фосфатидної кислоти в серці та печінці щурів при дії етанолу може відбуватися внаслідок пригнічення використання її в синтезі фосфоліпідів, зокрема кардіоліпіну [31, 251]. Крім того, фосфатидна кислота може утворюватися за участю мітохондріального пулу фосфоліпази D, яка локалізована в зовнішній мембрані мітохондрій, та може гідролізувати кардіоліпін до фосфатидної кислоти [252]. Рядом досліджень показано, що церамід підвищує активність фосфоліпази A2, яка піддає гідролізу кардіоліпін, знижуючи його вміст в клітинах. В той же час, вважається, що жирно-кислотна специфічність кардіоліпіну забезпечується ремоделюванням цього ліпиду, оскільки ферменти, відповідальні за його синтез *de novo*, не є специфічними для ацильних груп [3, 4]. У даній роботі аліментарні фактори нормалізували вміст кардіоліпіну і фосфатидної кислоти в серці та печінці експериментальних тварин (Рис. 3.9). Вочевидь, додавання до раціону поліненасичених жирних кислот риб'ячого жиру і кверцетину з одного боку запобігає розвитку оксидативного стресу і утворенню цитокінів і таким чином перешкоджає накопиченню цераміду в клітинах і розвитку клітинної дисфункції при дії етанолу, а з іншого боку додавання до раціону поліненасичених жирних кислот риб'ячого жиру може активізувати шляхи ремоделювання кардіоліпіну та підвищувати рівень цього фосфоліпиду.

Враховуючи разом результати, щодо підвищення вмісту цераміду в печінці та мозку щурів, що отримували етанол [51], та дані про пригнічення церамідом активності деяких метаболічних шляхів кардіоліпіну [238] та функціонування мітохондрій [23, 247], можна припустити, що зниження рівня кардіоліпіну в печінці та серці щурів при дії етанолу відбувалось

внаслідок підвищення рівня цераміду в цих тканинах. А відновлення вмісту кардіоліпіну і фосфатидної кислоти до рівня контрольних тварин при додаванні до харчового раціону кверцетина або n-3 поліненасичених жирних кислот риб'ячого жиру на тлі етанолу відбувалося завдяки здатності цих речовин ефективно знижувати вміст цераміду.

Таким чином, всі використані в даній роботі індуктори накопичення церамідів – доксорубіцин, етанол, пальмітинова кислота та збагачення раціону насиченими жирними кислотами призводили до зниження рівня кардіоліпіну в досліджених тканинах 3-місячних щурів. Для отримання чіткого доказу, що спостережуване зниження кардіоліпіну було викликане саме накопиченням цераміду ми використовували різні модулятори метаболізму цераміду в клітинах – іміпрамін, GW4869, міріюцин, кверцетин або n-3 поліненасичені жирні кислоти риб'ячого жиру разом із індукторами накопичення цього сфінголіпіду. У даній роботі збільшення вмісту кардіоліпіну в серці та печінці щурів досягалося шляхом пригнічення продукції цераміду, що передбачає взаємозв'язок між метаболізмом цих ліпідів. Крім того, утримання щурів на калорійно-обмеженому раціоні, який попереджав накопичення цераміду з віком, запобігало зниженню рівня кардіоліпіну в тканинах 24-місячних щурів.

### **3. 2. 2 Модуляція метаболізму кардіоліпіну за допомогою екзогенних натуральних і синтетичних церамідів у серці, ізольованих гепатоцитах та мозку 3-місячних щурів**

#### **3. 2. 2. 1 Вплив екзогенних церамідів на вміст кардіоліпіну в клітинах печінки та серця 3-місячних щурів**

У даній роботі встановлено зниження вмісту кардіоліпіну в серці і печінці старих щурів. Попередніми дослідженнями показано також збільшення вмісту цераміду в тканинах тварин при старінні. Крім цього

показано, що екзогенний керамід, внесений в середовище культивування молодих клітин імітує вікове накопичення ендогенних керамідів та сприяє формуванню фенотипу старої клітини [129]. При дії речовин, що індукують накопичення керамідів, також відбувається зниження вмісту кардіоліпіну. Разом з тим, використання n-3 поліненасичених жирних кислот риб'ячого жиру або кверцетину – препаратів, які попереджають накопичення керамідів, запобігало зниженню вмісту кардіоліпіну в серці і печінці щурів, які отримували етанол. Ці дані припускають щільний взаємозв'язок між рівнями кераміду і кардіоліпіну в клітинах. Для строгого доказу впливу рівня кераміду на вміст кардіоліпіну в нашій роботі, в середу культивування клітин або безпосередньо в тканини, вводили екзогенні природні або синтетичні кераміди. Раніше роботами нашої лабораторії було встановлено, що інкубація кератиноцитів у присутності синтетичного С2-кераміду, природних керамідів мозку або С18-керамідів призводила до залежного від концентрації сфінголіпіду збільшення вмісту кераміду цих клітин, а при тривалому впливі до пригнічення проліферації та індукції апоптозу [253]. Крім того, передбачається, що цитотоксичні і проапоптотичні ефекти керамідів залежать від довжини їх ацильних ланцюгів. У той же час встановлено, що індукція синтезу С18-кераміду в клітинах за участю дигідроцерамідсинтази-1 викликає апоптоз клітин карциноми. Тоді як, С16-керамід, що утворюється дією дигідроцерамідсинтази-6 надає антиапоптотичні ефекти і захищає пухлинні клітини карциноми від дії стресу [254]. У даній роботі вивчали дію С2-, С16- і С18-керамідів на вміст кардіоліпіну, фосфатидної кислоти і життєздатність ізолюваних клітин печінки молодих 3-місячних щурів [255, 256, 257, 258]. Крім того, вивчали вміст кардіоліпіну при введенні довголанцюгового природного С16-кераміду безпосередньо в серця 3-місячних щурів. В результаті перфузії сердець молодих щурів С16-керамідом спостерігалось суттєве зниження вмісту кардіоліпіну в серцевій м'язовій тканині в порівнянні з таким в серці контрольних 3-місячних тварин (Рис. 3.10).

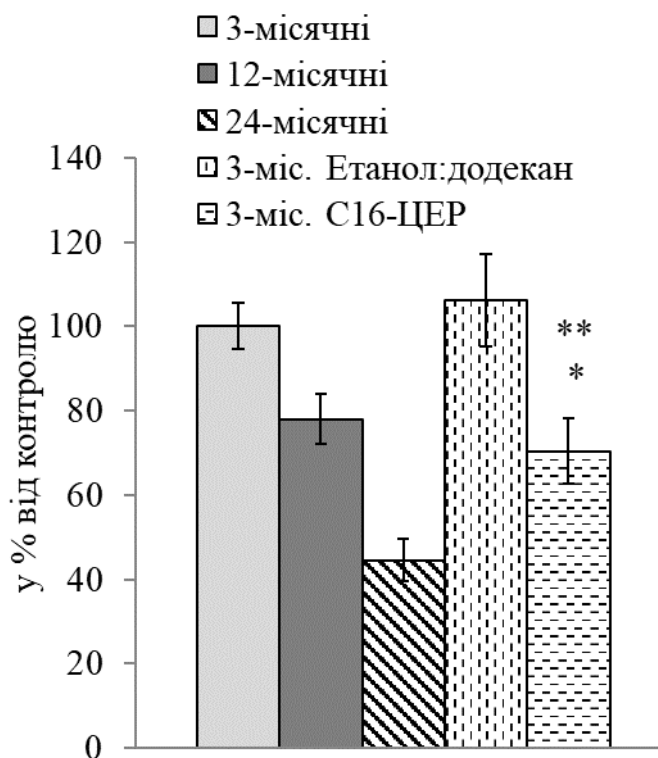


Рис. 3.10 Вплив короткочасної перфузії серця розчином C16-цераміду, на вміст кардіоліпіну в серці 3-місячних щурів

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з контрольними серцями, які перфузували етанол:додеканом

Відомо, що вміст цераміду в клітинах значно збільшується при старінні, а експериментальне збільшення цього ліпиду у молодих тварин може приводити до появи вікових зміни в їх клітинах [10, 50, 51, 127, 259, 260]. Так, показано, що при підвищенні рівня цераміду пригнічується реплікація ДНК і проліферація клітин, збільшується експресія  $\beta$ -галактозидази і апоптоз [260]. У ряді експериментів *in vitro*, та *in vivo* було показано, що активність ферменту  $\beta$ -галактозидази збільшується при старінні [261]. На теперішній час активність  $\beta$ -галактозидази розглядається як один з маркерів старіння клітини. Крім того, підвищення цераміду в клітинах молодих щурів дієтами або дією попередників синтезу церамідів призводить до порушення сигналізу інсуліну і тироксину, та індукує розвиток резистентності тканин до гормональних сигналів, подібно тому, як це

відбувається в клітинах-мішенях старих тварин [12, 13, 15, 48, 129]. За допомогою екзогенних керамідів було встановлено, що накопичення керамідів у клітинах пригнічує регулятор клітинного циклу Cdk2 і призводить до появи морфологічних змін, характерних для старої клітини. Порівнюючи зниження кардіоліпіну при природному старінні і при дії C16-керамиду на тканини серця молодих щурів можна відзначити, що екзогенний керамід наближав рівень кардіоліпіну до вмісту такого в серці 12-місячних щурів (Рис. 3.10). Відомо, що керамід регулює активність фосфоліпази A2 і фосфоліпази Д [262]. Ці дані дозволяють припустити, що спостережуване зниження кардіоліпіну може бути пов'язано з підвищенням активності фосфоліпази A2, яка розщеплює кардіоліпін на монолізокардіоліпін і жирні кислоти. В той же час, в мітохондріях знайдено особливий мітохондріальний пул фосфоліпази Д, тому зниження рівня кардіоліпіну може бути обумовлено дією фосфоліпази Д, яка піддає гідролізу кардіоліпін з утворенням фосфатидної кислоти. Той факт, що в нашій роботі зниження вмісту кардіоліпіну викликане накопиченням керамиду відбувається на тлі збільшення вмісту фосфатидної кислоти дозволяє припустити, що ефекти керамиду на рівень кардіоліпіну можуть бути опосередковані шляхом підвищення активності мітохондріальної фосфоліпази Д.

Експерименти, проведені з синтетичним аналогом керамиду, що має скорочений жирнокислотний ланцюг, N-ацетил-d-еритро-сфінгозином (C2-керамід), показали, що керамід здатний індукувати загибель клітин, викликаючи міжнуклеосомну деградацію ДНК і деякі морфологічні зміни в структурі клітини [127, 128]. Для порівняння ефектів природних та синтетичних керамідів на вміст кардіоліпіну, в даній роботі до середовища інкубації гепатоцитів 3-місячних щурів додавали кераміди з різною довжиною ацильного ланцюга (C2-керамід, C16-керамід або C18-керамід). Крім того, вивчалась залежність ефектів C2-керамиду від його концентрації в інкубаційному середовищі на вміст кардіоліпіну в гепатоцитах 3-місячних

щурів [255, 256, 257, 258]. Встановлено, що інкубація гепатоцитів з високими концентраціями довголанцюгових С16- і С18-церамідів (60  $\mu\text{M}$ ) призводила до зниження вмісту кардіоліпіну на 25 % і 28 % відповідно. У той же час, коротколанцюговий С2-церамід в концентрації 15  $\mu\text{M}$  викликав зниження кардіоліпіну на 54 %, а збільшення концентрації цього цераміду призводило до подальшого падіння рівня кардіоліпіну (Рис. 3.11). Крім того, при дії зростаючих концентрацій С2-цераміду спостерігалось зниження частки кардіоліпіну щодо інших фосфоліпідів в клітині (Рис. 3.12).

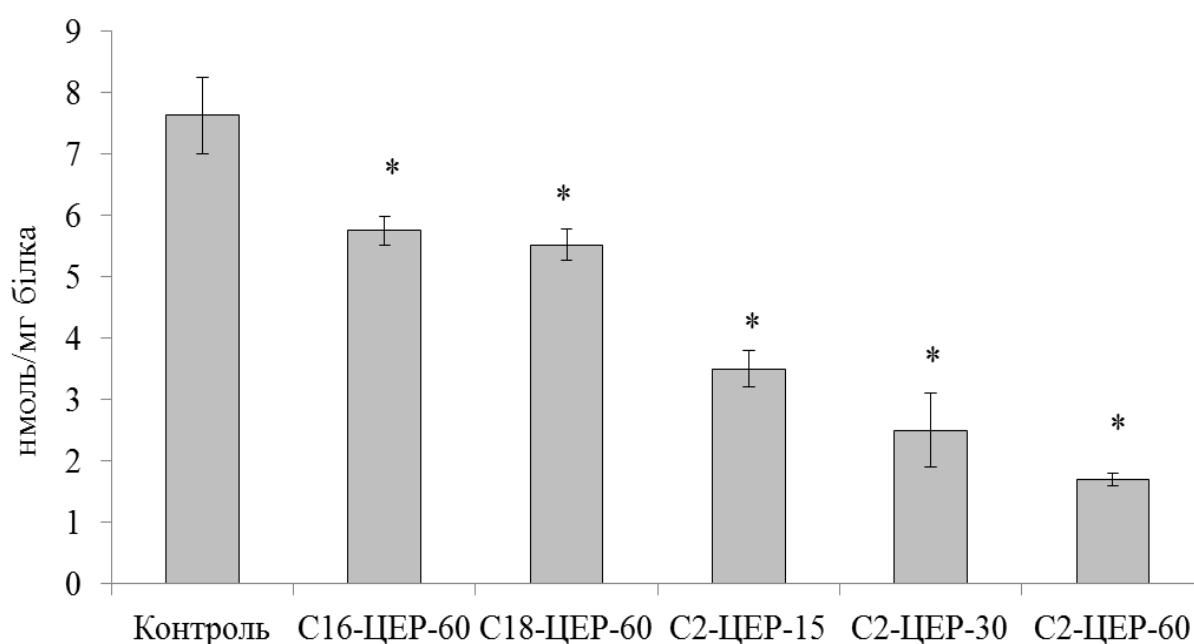


Рис. 3.11 Вплив церамідів з різною довжиною ацильного ланцюга на вміст кардіоліпіну в гепатоцитах 3-місячних щурів

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Контроль»

Передбачається, що ефекти церамідів у клітинах визначаються їх внутрішньоклітинною локалізацією. Так цераміди, які синтезуються *de novo* в ендоплазматичному ретикулумі, регулюють процеси апоптозу [137], а цераміди, утворені в плазматичній мембрані, пригнічують сигнальний шлях NF $\kappa$ B і переміщення протеїнкінази С в мембрану, не блокуючи клітинного циклу [263]. Показано, що при стимулюванні апоптозу TNF- $\alpha$  або радіацією,



церамід, синтезований *de novo* в ендоплазматичному ретикулумі, транспортується в мітохондрії [21]. У той же час, кардіоліпін є фосфоліпідом, зниження якого також пов'язують з розвитком апоптозу.

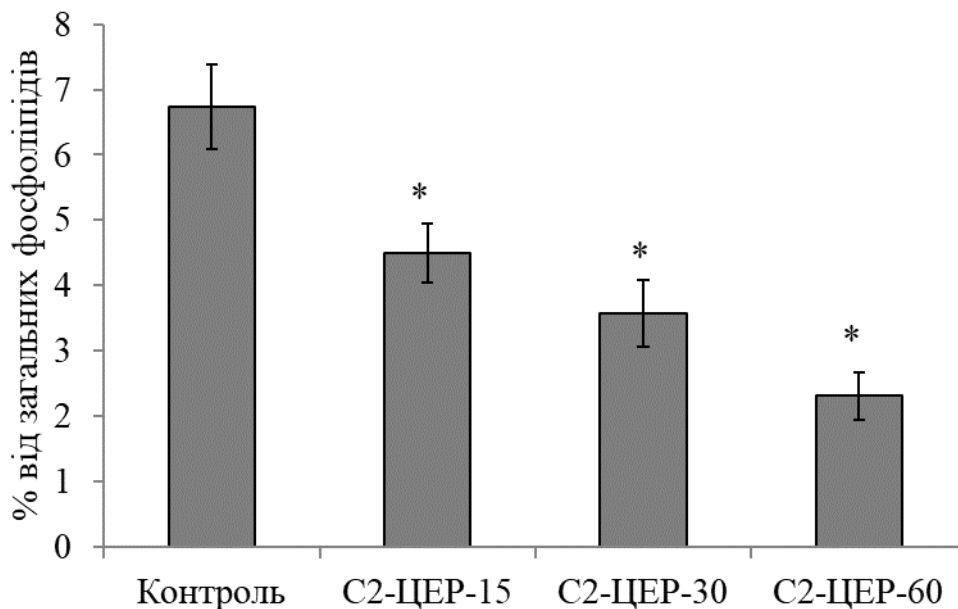


Рис. 3.12 Вплив різних концентрацій C2-цераміду на вміст кардіоліпіну в гепатоцитах 3-місячних щурів

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Контроль»

Встановлено, що кардіоліпін в мембранах мітохондрій щільно пов'язаний з цитохромом с, утримуючи його в мембрані. При зниженні вмісту кардіоліпіну цитохром с вивільняється з мітохондрій та запускає процес апоптозу. Встановлені в нашій роботі розбіжності ефектів коротко- і довголанцюгових керамідів, можуть бути пов'язані з різними шляхами їх метаболізму. Це припущення підтверджується експериментами в яких, було встановлено, що додавання довголанцюгового C18-цераміду в культуру епітеліальних клітин викликало зростання рівня сфінгомієліну, що передбачає активізацію шляхів швидкого перетворення кераміду в сфінгомієлін [253]. У той же час, внесення C2-цераміду в культуру цих клітин не призводило до збільшення сфінгомієліну, і зростанню рівня ендогенних довголанцюгових керамідів.

Крім зниження вмісту кардіоліпіну при дії екзогенних церамідів спостерігалось зменшення включення  $[^{14}\text{C}]$ лінолевої кислоти до складу кардіоліпіну (Рис. 3.13).

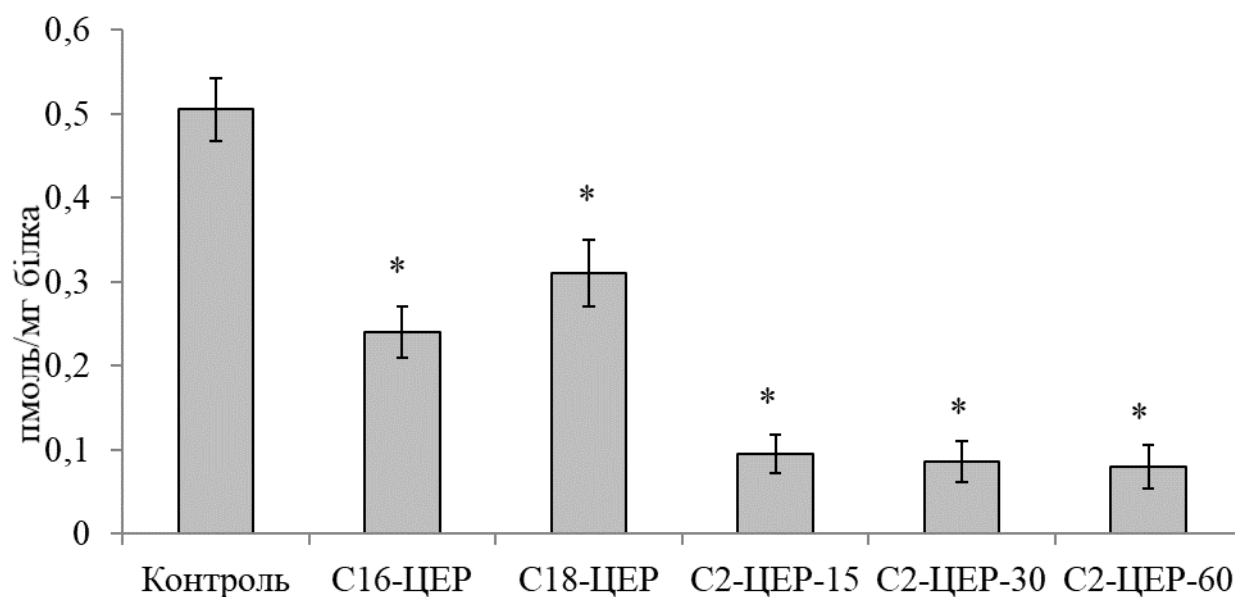


Рис. 3.13 Вплив екзогенних церамідів на включення  $[^{14}\text{C}]$ лінолевої кислоти до складу кардіоліпіну в гепатоцитах 3-місячних щурів

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Контроль»

Кардіоліпін набуває характерного складу жирних кислот шляхом пост-синтетичного ремоделювання. Ремоделювання кардіоліпіну залежить від активності ферменту тафазіну – неспецифічної фосфоліпідлізофосфоліпідтрансацилази. У той же час, церамід може впливати на синтез кардіоліпіну, регулюючи фермент його синтезу – фосфатидилгліцерофосфатсинтазу [238]. На клітинах раку молочної залози MDA-MB-231 було показано, що введення пальмітинової кислоти призводило до зниження рівня кардіоліпіну після короточасного посилення його синтезу [214]. Передбачається, що синтез кардіоліпіну може регулюватися сфінголіпідами. Так, фармакологічне пригнічення серинпальмітоїлтрансферази збільшувало синтез кардіоліпіну в кардіоміоцитах AC16 [264]. Крім того, зниження цераміду в серці нокаутних мишей з дефіцитом специфічною для кардіоміоцитів

серинпальмітоїлтрансферази – Sptlc2, супроводжувалось збільшенням вмісту кардіоліпіну і посиленням експресії генів синтезу цього ліпиду [264].

У той же час, високі концентрації досліджених церамідів поряд зі зниженням рівня кардіоліпіну в даних умовах експерименту призводили до накопичення попередника в синтезі фосфоліпідів – фосфатидної кислоти (Рис. 3.14), причому пропорційне зниження кардіоліпіну супроводжувалося відповідним зростанням вмісту фосфатидної кислоти. Відомо, що фосфатидна кислота в клітинах міститься в невеликій кількості, і є важливим проміжним продуктом синтезу фосфоліпідів. У зв'язку, з чим накопичення фосфатидної кислоти в клітинах передбачає пригнічення її подальшого перетворення в гліцерофосфоліпиди, і зокрема в кардіоліпін. Не виключено, що індукована церамідом деградація кардіоліпіну та/або інших фосфоліпідів, під дією фосфоліпази Д, може призводити до накопичення фосфатидної кислоти в клітинах печінки.

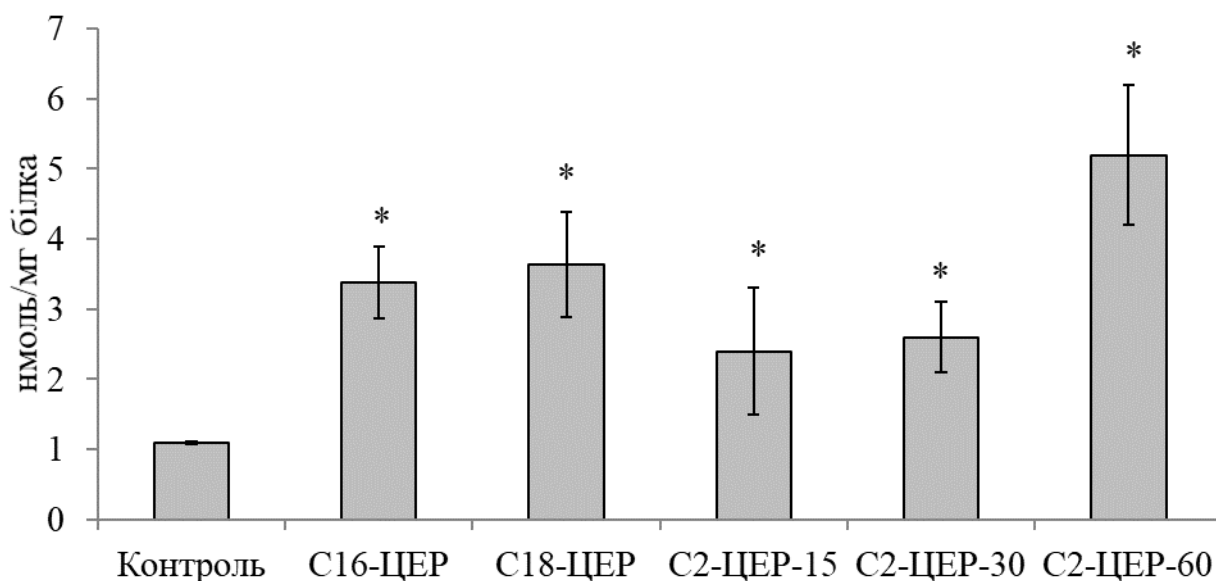


Рис. 3.14 Вплив екзогенних церамідів на вміст фосфатидної кислоти в гепатоцитах 3-місячних щурів

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Контроль»

Встановлене в даній роботі, зниження вмісту кардіоліпіну при додаванні до середовища інкубації гепатоцитів великих концентрацій

цераміду, супроводжувалося зниженням життєздатності цих клітин (Рис. 3.15). Так, при дії 15  $\mu\text{M}$  C2-цераміду життєздатність гепатоцитів знижувалася не суттєво, тоді як більші концентрації – 30 і 60  $\mu\text{M}$  C2-цераміду і 60  $\mu\text{M}$  довголанцюгових церамідів призводять до значного зниження життєздатності гепатоцитів вже через 3 години інкубації. Раніше було показано, що дія C2-, C16- і C18-церамідів у концентрації 5 і 10 мкг/мл не призводять до зниження життєздатності гепатоцитів [127]. У той же час, показано, що C18-церамід і C2-церамід в концентрації 15, 30 і 60  $\mu\text{M}$  приводили до апоптозу клітин епітелію [253].

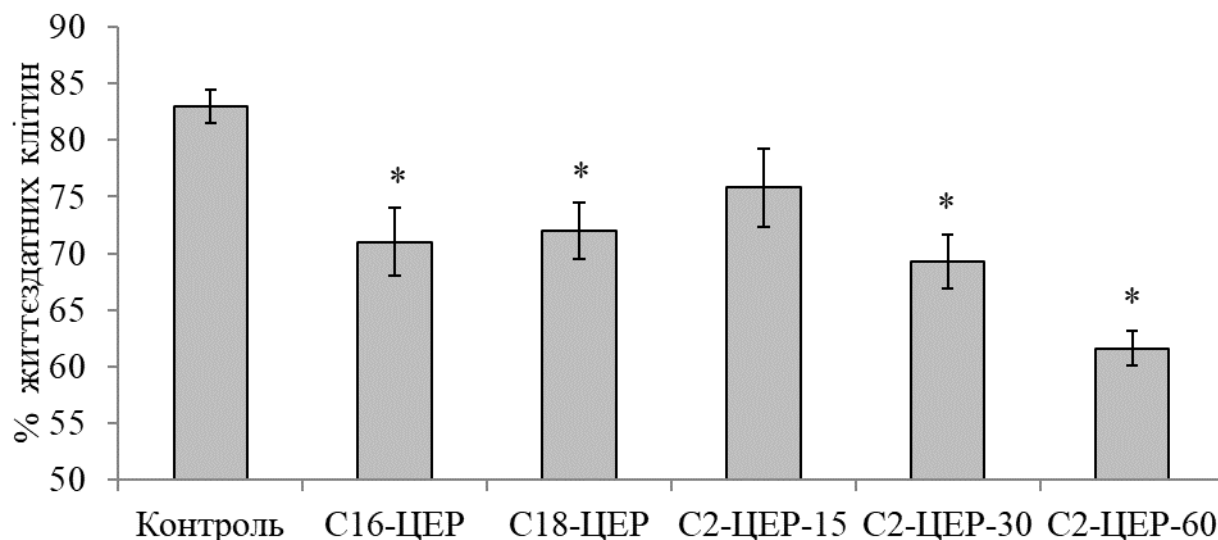


Рис. 3.15 Вплив екзогенних церамідів на життєздатність гепатоцитів 3-місячних щурів

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Контроль»

Низкою сучасних досліджень показано, що коротко- і довголанцюгові цераміди, здатні утворювати в мембранах мітохондрій стабільні ділянки підвищеної проникності, так звані церамідні канали, пропускну здатність яких залежить від концентрації вільного цераміду в мембрані [265, 266]. Дослідження впливу N-ацетил-d-еритро-сфінгозину на клітини нейробластоми (NB16), проведені Ramos B. та співавторами, показали, що C2-церамід (20  $\mu\text{M}$ ) знижує життєздатність клітин на 75 % через 24 години і

викликає появу некротичних клітин, тоді як обробка цих клітин С2-церамідом в концентрації 40  $\mu\text{M}$  призводила до збільшення кількості пошкоджених клітин в ранні терміни інкубації [267]. В експериментах Guo Y.L. та співавторів С2-церамід (12  $\mu\text{M}$ ), введений в культуру мезенгіальних клітин, не впливав на їх життєздатність, однак, при високих концентраціях С2-цераміду (50  $\mu\text{M}$ ) вже після 4 годин інкубації життєздатність мезенгіальних клітин знижувалася на 50 % [268].

З огляду на те, що зниження вмісту кардіоліпіну призводить до вивільнення з мембран мітохондрій цитохрому с, можна припустити, що апоптотичні ефекти цераміду можуть бути опосередковані не тільки підвищенням проникності мембран мітохондрій, а й його дією на ключові ферменти метаболізму кардіоліпіну. Зниження життєздатності гепатоцитів при дії великих концентрацій коротколанцюгового С2-цераміду (30  $\mu\text{M}$  та 60  $\mu\text{M}$ ) супроводжувалося вивільненням в середовище інкубації вільних жирних кислот, диацилгліцеролів, триацилгліцеролів і фосфоліпідів (Табл. 3.4), тоді як менші концентрації (15  $\mu\text{M}$ ) не чинили подібного ефекту. Встановлено, що вільні жирні кислоти і диацилгліцероли зростали в середовищі інкубації при дії 60  $\mu\text{M}$  С2-цераміду в 2,4 рази щодо контролю, а триацилгліцероли та фосфоліпіди при дії 60  $\mu\text{M}$  С2-цераміду збільшувалися в 2,6 разів відносно контрольної групи.

При експериментальній індукції апоптозу лейкемичних клітин людини (U937 і Jurkat) встановлено, що загибель клітин супроводжується збільшенням вмісту фосфоліпідів і вільних жирних кислот в середовищі культивування [269]. Подібні зміни автори пов'язують з формуванням апоптотичних тілець, які складаються з компонентів плазматичних мембран. При цьому ранні ознаки апоптотичних змін в клітинах спостерігалися вже після першої години інкубації з екзогенним церамідом [269]. З огляду на те, що зниження життєздатності гепатоцитів при дії 30 і 60  $\mu\text{M}$  С2-цераміду супроводжувалося вивільненням триацилгліцеролів, диацилгліцеролів, фосфоліпідів та вільних жирних кислот (Рис. 3.15, Табл. 3.4), можна зробити

висновок про загибель деяких клітин. Це припущення підтверджується появою апоптотичних змін в клітинах епітелію після 24-годинної інкубації з C18- і C2-церамідами [253].

Таблиця 3.4

**Вміст ліпідів, у середовищі інкубації при дії різних концентрацій  
C2- цераміду на гепатоцити 3-місячних щурів**

	Вільні жирні кислоти	Фосфоліпіди	Диацилгліцероли	Триацилгліцероли
Контроль	40,96±1,52	37,02±2,28	22,26±1,02	24,11±1,02
C2-церамід (15 μM)	41,61±2,98	36,43±0,59	21,6±0,52	25,25±0,44
C2-церамід (30 μM)	54,12±3,2 *	50,98±0,94 *	31,93±0,99 *	38,36±0,53*
C2-церамід (60 μM)	99,36±2,31 *	96,69±6,37 *	53,29±3,06*	61,83±7,57*

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Контроль». Данні представлені в нмолях/мг білка

Таким чином встановлено, що використані в роботі екзогенні натуральні і синтетичні цераміди істотно знижують вміст кардіоліпіну в серці і клітинах печінки 3-місячних щурів. Падіння рівня кардіоліпіну, в свою чергу, може провокувати зниження життєздатності гепатоцитів і передувати вивільненню диацилгліцеролів, триацилгліцеролів, фосфоліпідів та вільних жирних кислот в середовище культивування клітин. Отримані дані дозволяють розглядати зменшення вмісту кардіоліпіну в гепатоцитах при дії 15 μM C2-цераміду, як ранній маркер погіршення життєздатності гепатоцитів. Отримані дані свідчать про те, що збільшення в клітинах вмісту цераміду опосередковує зниження рівня кардіоліпіну, що в подальшому може призводити до загибелі клітин і розвитку патологій серця і печінки.

### **3. 2. 2. 2 Вплив екзогенного C16-цераміду на вміст кардіоліпіну в гіпокампі і корі мозку та поведінку 3-місячних щурів**

У даній роботі встановлено зниження вмісту кардіоліпіну, як при дії індукторів накопичення церамідів (доксорубіцину, етанолу, пальмітинової кислоти, насичених жирних кислот раціону), так і при внесенні екзогенних церамідів (C2-, C16- і C18-церамідів) до середовища культивування клітин. Крім того, зниження вмісту кардіоліпіну спостерігалось в клітинах печінки, серця, кори мозку і гіпокампі 24-місячних щурів. Також встановлено, що додавання до середовища культивації гепатоцитів екзогенних церамідів призводить до зниження вмісту кардіоліпіну та життєздатності клітин печінки. Аналіз отриманих результатів дозволяє припустити, що зниження вмісту кардіоліпіну може передувати порушенню функціонування мітохондрій і розвитку ряду патологій, асоційованих зі старінням.

В останні роки велика увага приділяється питанням мітохондріальної дисфункції як причині, що призводить до розвитку нейродегенерації, і патогенезу хвороби Альцгеймера, Паркінсона, Гантігтона, бічного аміотрофічного склерозу, спадкової спастичної параплегії та захворювань мозочка [16]. З іншого боку, відомо, що асоційовані з віком нейродегенерації можуть бути пов'язані з накопиченням цераміду [270, 271, 272]. Однак механізми нейродегенеративних порушень, викликаних накопиченням цераміду залишаються недостатньо вивченими. Так, індукція апоптозу при введенні екзогенних церамідів у середовище культивації деяких нейрональних клітин була встановлена на клітинах нейробластоми людини, нейронах середнього мозку і гранулярних клітинах мозочка [273, 274, 275, 276]. Крім того, сучасні уявлення про розвиток депресії припускають, що зміна клітинної пластичності в гіпокампі і порушення балансу між нейрогенними і апоптотичними процесами призводить до нейродегенерації та атрофії гіпокампі [150]. У той же час, застосування антидепресантних препаратів збільшують нейрогенез і можуть запобігати порушенню функцій

гіпокампу [150]. Виходячи з цього, наступним напрямком нашої роботи стало дослідження ефекту С16-цераміду на вміст кардіоліпіну в корі головного мозку і гіпокампі, та на поведінку молодих щурів.

Останнім часом багатьма дослідниками пропонується інтраназальний спосіб введення фармакологічних препаратів, як перспективний і найменш травматичний порівняно з ін'єкційним способом введення [277, 278]. При інтраназальному введенні фармакологічні препарати не беруть участі в первинному метаболізмі в печінці, так як швидко виявляються в крові завдяки багатому кровоносним судинами епітелію носової порожнини можуть доставлятися безпосередньо в ЦНС [150]. В даний час, цей спосіб введення лікарських препаратів розглядається як перспективна альтернатива в лікуванні хвороби Альцгеймера та Паркінсона, депресивно-подібних розладів і інших патологій ЦНС [279]. З метою збільшення вмісту цераміду в мозку тварин в наступній серії експериментів молодим 3-місячним щурам вводили С16-церамід шляхом інтраназального вприскування.

В результаті експерименту спостерігалася поява деяких особливостей в поведінці піддослідних щурів. Так встановлено, що під дією С16-цераміду щури починали віддавати перевагу воді вже після 4-го внутрішньоназального введення С16-цераміду (Рис. 3.16 А), 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 [280, 281, 282]. Крім того, в даній роботі було проведено порівняння схильності до вживання солодкого розчину між інтактними щурами 3-, 24- та 30-32-місячного віку (Рис. 3.16 Б), та виявлено, що старі щури в значно меншому ступені віддають перевагу розчину сахарози, ніж молоді 3 місячні тварини.



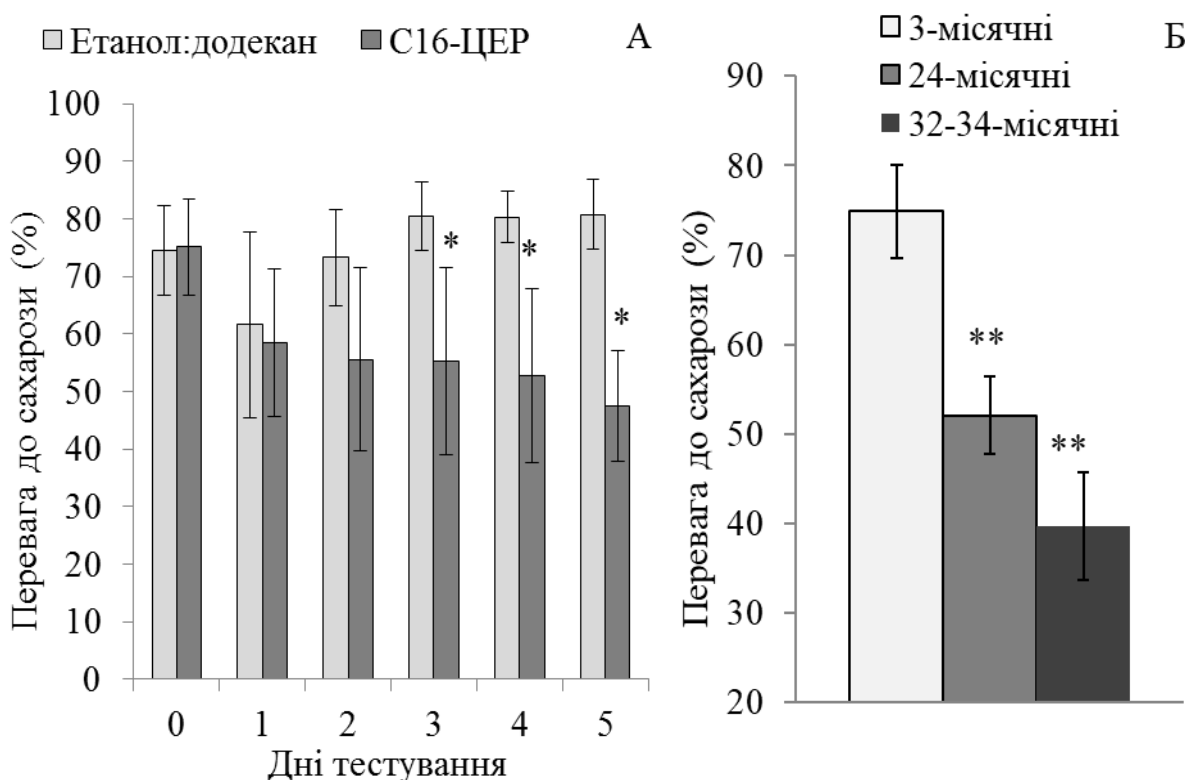


Рис. 3.16 Перевага до вживання розчину сахарози (2 %) відносно загального об'єму вжитої рідини за добу

Примітки:

1. А – щури, що отримували C16-церамід, шляхом внутрішньоназального введення; Б – порівняння вікових особливостей переваги до сахарози в інтактних щурів;
2. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Етанол:додекан»; \*\* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «3-місячні»;
3. Дані представлені у % від загальної кількості вжитої рідини

З огляду на те, що багато дослідників пов'язують вікове накопичення цераміду в мозку з появою депресивно-подібних станів [150], можна припустити, що саме збільшення цераміду в мозку 3-місячних щурів може відповідати за розвиток ангедонії. В даний час для виявлення тривожності та депресивно-подібних змін в поведінці тварин застосовують різні тести. Одним з таких тестів є аналіз часу нерухомості при імобілізації щура за хвіст. Відомо, що тварина, яка схильна до депресивно-подібного стану,

менше часу витрачає на спроби вивільнитися з незручного становища [283, 284, 285].

Значне збільшення часу нерухомості тварин, які отримували С16-церамід (Рис. 3.17) підтверджує результати отримані при аналізі переваги до сахарози і характеризують розвиток депресивно-подібної поведінки при дії С16-церамиду.

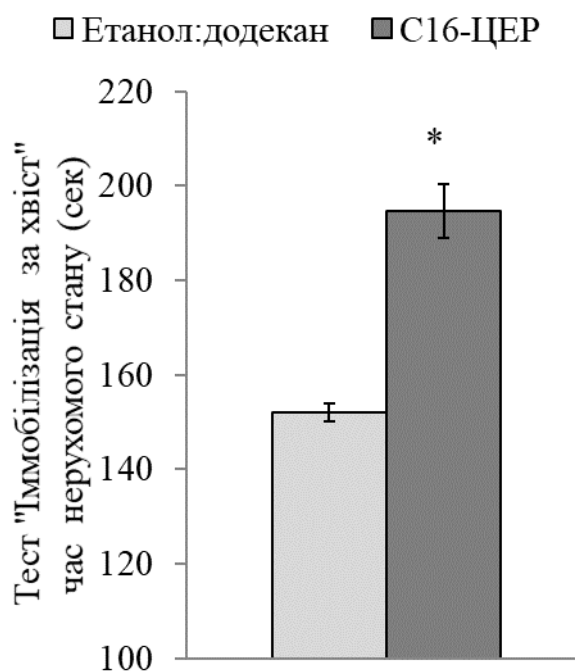


Рис. 3.17 Час нерухомості в тесті імобілізації за хвіст щурів, які отримували С16-церамід шляхом внутрішньоназального введення

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Етанол:додекан»

В даний час тест «темний/світлий відсік» застосовується для оцінювання тривожності у гризунів. Камера складається з «безпечного» темного відсіку і яскраво освітленого – світлого відсіку, що створює конфліктну ситуацію для тварини, схильного з одного боку досліджувати нову територію і страху перед невідомою світлою частиною камери. Вважається, що тривалість перебування в темному відсіку корелює з рівнем тривожності, тоді як число виходів до світлого відсіку і час його обстеження – характеризує дослідницьку активність тварин [286]. У даній роботі в тесті

«темний/світлий відсік» спостерігалось зменшення кількості переходів до світлого відсіку (Рис. 3.18 А) і зниження локомоторної активності щурів (Рис. 3.18 Б), які отримували С16-церамід шляхом внутрішньо назального введення. Разом з цим, під впливом назального введення С16-цераміду у щурів значно збільшувався час, проведений в темному відсіку (Рис. 3.18 В). Ці дані свідчать про те, що введення С16-цераміду призводило до зниження дослідницької активності щурів та підвищення тривожності у цих 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. Вважається, що, незважаючи на голод, щури витрачають деякий час на дослідження незнайомої території, і тривалість часу, витраченого на дослідження клітки перед початком їжі, характеризує збільшення тривожності тварин. При вивченні ефектів внутрішньоназального введення С16-цераміду встановлено, що контрольні тварини набагато менше часу витрачали на дослідження нової території та швидше адаптувалися до нової обстановки на відміну від тварин дослідної групи (Рис. 3.18 Г).

При вивченні особливостей поведінки тварин не менш важливі тести оцінки грумінгу і інстинкти догляду за собою. Показано, що введення цераміду в гіпокамп мишей призводило до зміни поведінкових реакцій цих тварин, зокрема, шерстка цих мишей ставала неохайною, що свідчить про порушення поведінкових реакцій «догляду за собою» і характеризує розвиток депресивно-подібних станів [150]. У нашій роботі поведінкові реакції «догляду за собою» досліджували в тесті «Сплеш», при якому мордочку щура обприскували концентрованим солодким розчином, що призводило до активізації очисних реакцій у щурів.

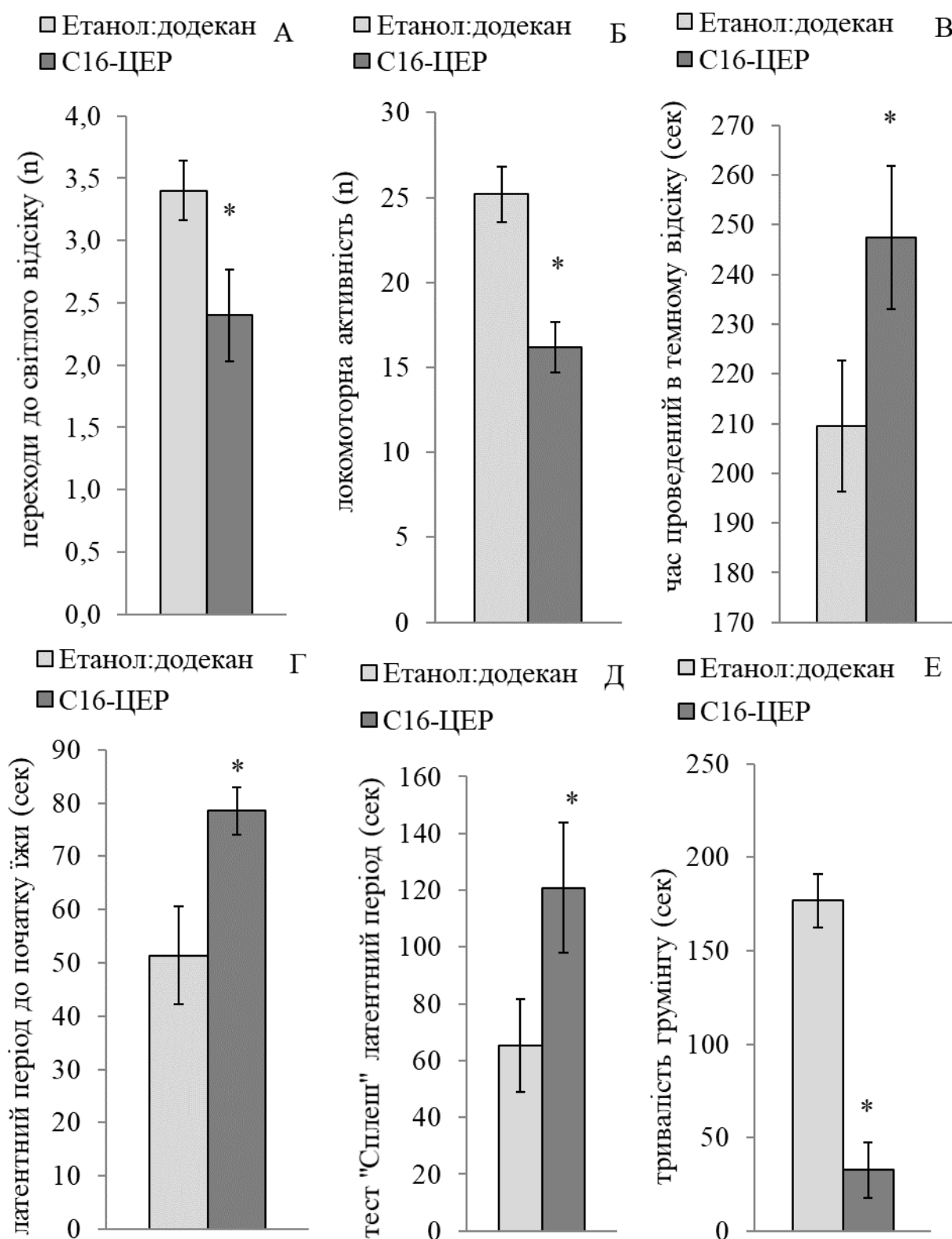


Рис. 3.18 Особливості поведінки щурів після назального введення C16-цераміду в тестах «Темний/світлий відсік» (А-В), при годуванні в незнайомій обстановці (Г), та «Сплеш-тесті» (Д, Е)

Примітка. \* –  $p < 0.05$  у порівнянні з групою «Етанол:додекан»

Встановлено, що введення С16-цераміду призводило до збільшення часу протягом, якого у тварин дослідної групи з'являлася необхідність грумінгових реакцій (Рис. 3.18 Д), а загальний час, витрачений на очисні реакції зменшувався (Рис. 3.18 Е).

Таким чином, аналіз різних поведінкових тестів, проведених після введення С16-цераміду 3-місячним тваринам, свідчить про розвиток депресивно-подібного стану і зростання тривожності у щурів дослідної групи. Крім того, порівняння поведінки молодих (3-місячних), старих (24-місячних) і дуже старих (30-32-місячних) щурів виявило зміни в поведінці щурів в пізньому онтогенезі (Рис. 3.19) подібні спостережуваним при введенні С16-цераміду 3-місячним тваринам. Зміни поведінки тварин і розвитку депресивно-подібного стану з віком відбуваються на тлі збільшення рівня цераміду і зниження вмісту кардіоліпіну в гіпокампі і корі старих тварин [150].

Фізіологія депресивно-подібних станів залишається нез'ясованою, хоча існують різні теорії щодо механізмів її розвитку. Останнім часом деякими дослідниками вважається, що дисфункція мітохондрій в різних ділянках мозку може бути пов'язана з розвитком депресивних станів [287, 288]. Так, було показано, що хронічний стрес пригнічує процеси окисного фосфорилування в мітохондріях, і призводить до пошкоджень ультраструктури цих органел в різних областях мозку, включаючи гіпокамп, кору і гіпоталамус мишей [289, 290].

Мітохондрії грають роль у виробництві АТФ, балансу активних форм кисню і виконання складних процесів нейротрансмісії. З огляду на, те що церамід може реалізовувати свої ефекти впливаючи на мітохондрії, а функціональний стан цих органел щільно пов'язаний з рівнем важливого мітохондріального ліпиду – кардіоліпіну, в нашій роботі вивчали зміни вмісту кардіоліпіну та ендогенного цераміду в гіпокампі щурів в умовах введення С16-цераміду.

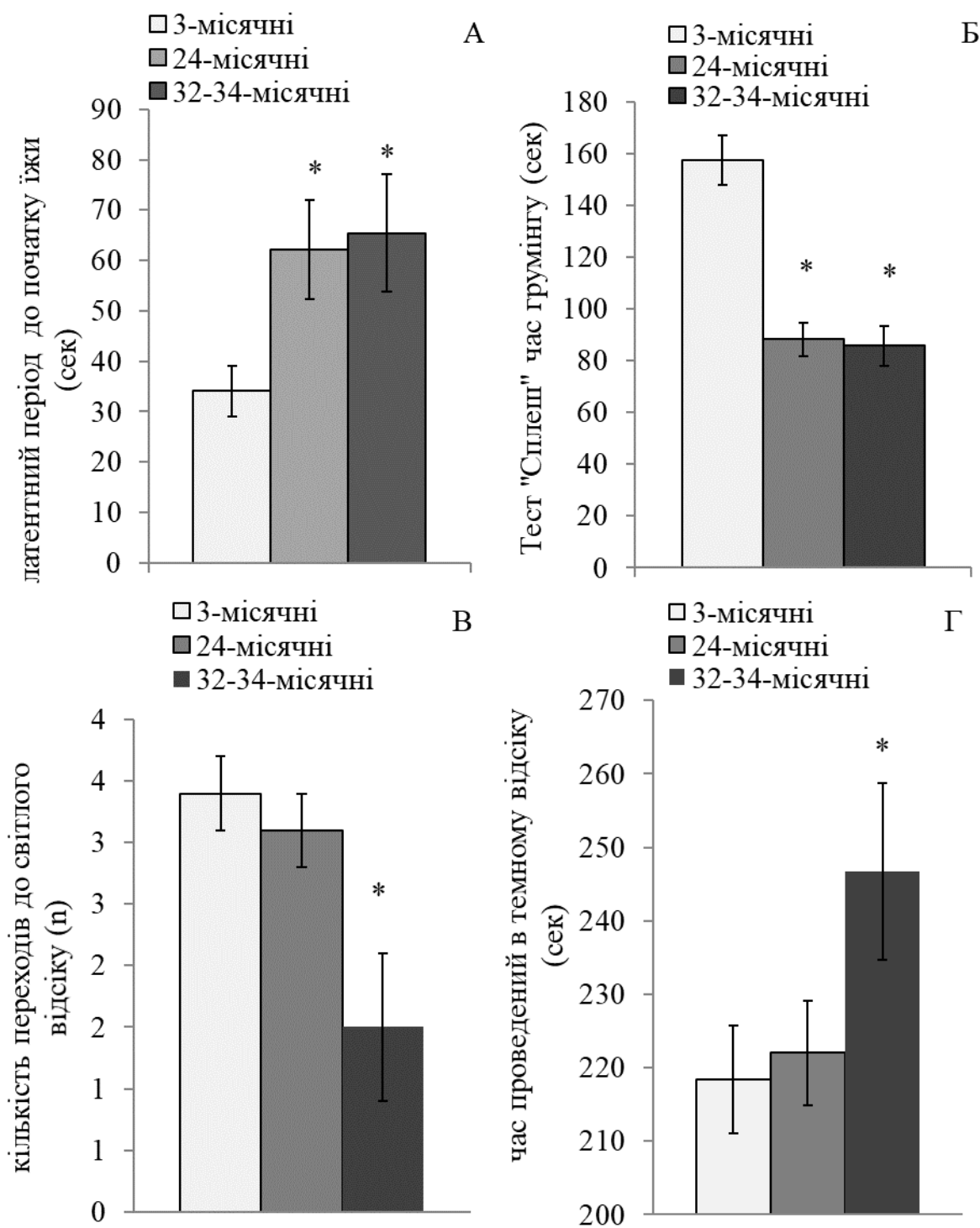


Рис. 3.19 Особливості поведінки щурів різного віку при годуванні в незнайомій обстановці (А), в «Сплеш-тесті» (Б) і в тесті «Темний/світлий відсік» (В, Г)

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою 3-місячних щурів

В ході цієї роботи було встановлено, що внутрішньоназальне введення С16-цераміду 3-місячним щурам призводило до зростання вмісту ендogenousних церамідів, і зменшенню рівня кардіоліпіну в гіпокампі (Рис. 3.20).

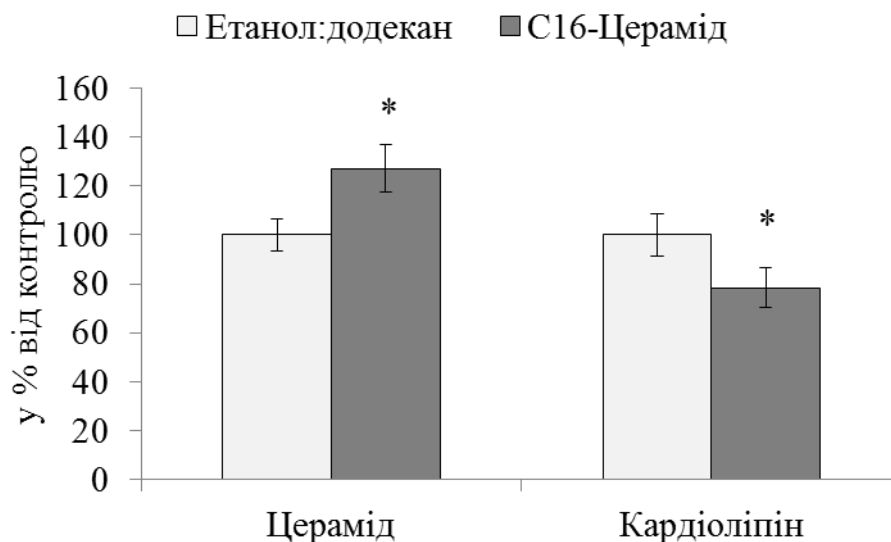


Рис. 3.20 Ефекти С16-цераміду на вміст цераміду та кардіоліпіну в гіпокампі

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Етанол:додекан»

Таким чином, в даній роботі встановлено взаємозв'язок між змінами вмісту кардіоліпіну і цераміду, а також розвитком асоційованої з віком тварин депресивно-подібної поведінки. Зростання вмісту цераміду в гіпокампі молодих щурів шляхом введення С16-цераміду за допомогою внутрішньоназального введення призводив до зниження вмісту кардіоліпіну в мозку і появи депресивно-подібних особливостей поведінки: у щурів дослідної групи зменшувався час, витрачений на очисні реакції, з'являлася ангедонія, знижувалася локомоторна і дослідницька активність, зростала тривожність щурів. З огляду на те, що церамід може безпосередньо впливати на мітохондрії та мітохондріальні ліпіди, отримані дані дозволяють припустити, що збільшення рівня цераміду в мозку веде до порушень метаболізму кардіоліпіну, і зниження рівня цього ліпиду, що в свою чергу викликає появу депресивно-подібних розладів у щурів.

### 3. 3 Вплив інгібіторів обміну сфінголіпідів на вміст кардіоліпіну в тканинах і клітинах та поведінку 24-місячних щурів

В попередніх дослідженнях ми моделювали підвищений рівень кераміду в клітинах і тканинах молодих щурів за допомогою індукторів накопичення кераміду: доксорубіцину, етанолу, пальмітинової кислоти, дієти з насиченими жирними кислотами, або введення екзогенних керамідів різної природи, з метою вивчення їх ефектів на метаболізм кардіоліпіну. Встановлено, що при індукції накопичення кераміду, спостерігалось зниження рівня кардіоліпіну, а препарати да дієти, що запобігали накопиченню кераміду попереджали зниження кардіоліпіну. Результати, отримані в експериментах на клітинах і тканинах молодих тварин, припускають щільний взаємозв'язок метаболізму сфінголіпідів та кардіоліпіну. У той же час численними роботами встановлено накопичення кераміду в різних тканинах старих тварин [142, 143, 144]. Одними з основних шляхів утворення кераміду в клітинах є синтез *de novo* в мітохондріях та ендоплазматичному ретикулумі за участю керамідсинтаз та при деградації мембранного сфінгом'єліну групою ферментів сфінгом'єліназ. Вважається що при старінні основна маса кераміду в клітинах утворюється в результаті активації сфінгом'єліназ, а не шляхом синтезу *de novo* [6, 142, 144]. Зсув балансу в обміні сфінголіпідів у напрямку генерації кераміду може приводити до індукції апоптозу, як шляхом кластеризації рецепторів, що задіяні в передачі апоптотичних сигналів на мембрані, так і участю кераміду в активації каспаз та утворенні мітохондріальних пор [17, 18]. Вікове накопичення кераміду в клітинах деякі дослідники пов'язують з надмірною активацією сфінгом'єліназ [142]. Клас сфінгом'єліназ поділяють на кислі та нейтральні. Найбільш ефективними інгібіторами кислої сфінгом'єлінази є фосфоінозит-ліпіди – вторинні месенджери інозит-3-фосфатного сигнального каскаду [158]. Однак, через погану проникність мембран введення



фосфоінозит-ліпідів в клітині для пригнічення сфінгомеліназної активності не набуло поширення [158]. У той же час, для деградації кислої сфінгомелінази успішно застосовуються трициклічні антидепресанти, наприклад іміпрамін і амітриптилін [159]. Основним ефектом препаратів цього ряду є блокада зворотного захоплення нейромедіаторів адренергічних рецепторів, проте ряд досліджень вказує на те, що пригнічення сфінгомеліназної активності також вносить значний вклад в антидепресантний ефект іміпраміну [292]. Іміпрамін (Рис. 3.21 А) ефективно пригнічує кислоту сфінгомеліназу шляхом порушення її зв'язку з негативно зарядженими ліпідами лізосомальних мембран, після чого фермент піддається протеолізу [4, 160].

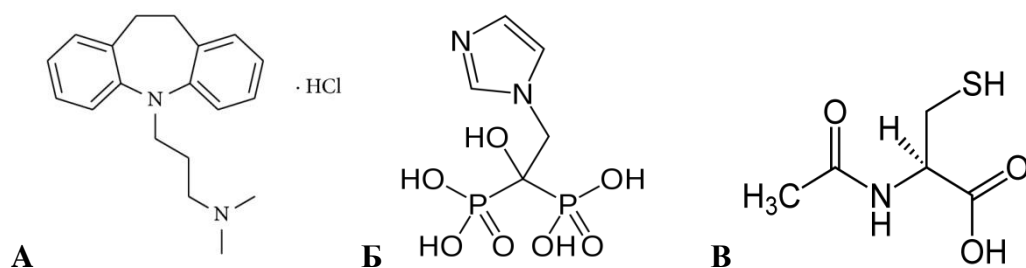


Рис. 3.21 Структурні формули іміпраміну гідрохлориду (А), золедронової кислоти (Б) та N-ацетилцистеїну (В)

Зв'язування активного центру кислої сфінгомелінази можна досягти застосовуючи препарати на основі бифосфонатів, наприклад золедронову кислоту [158]. Золедренова кислота (Рис. 3.21 Б) пригнічує активність кислої сфінгомелінази шляхом утворення стабільного комплексу з  $Zn^{2+}$  в реакційному центрі ферменту [158]. Золедренова кислота використовується, зокрема при лікуванні остеопорозу, причому, природа її впливу на остеокласти залишається не до кінця з'ясованою [161]. Можливо, в даному випадку пригнічення кислої сфінгомелінази також вносить значний вклад в терапевтичний ефект. Іміпрамін та золедренова кислота широко використовуються при експериментальному селективному пригніченні кислої сфінгомелінази при інкубації клітин *in vitro* [154, 158]. Крім того

встановлено, що N-ацетилцистеїн (Рис 3.21 В) широко використовуваний *in vivo* та *in vitro* антиоксидант, в той же час є інгібітором нейтральної сфінгомієлінази [293]. Введення старим тваринам N-ацетилцистеїну викликає пригнічення нейтральної сфінгомієлінази, активність якої підвищується з віком в різних тканинах, та зниження рівня кераміду в гіпокампі, корі мозку, сироватці крові, скелетних м'язах та нирках [293, 294]. Беручи до уваги, що накопичення керамідів у тканинах супроводжується зниженням вмісту кардіоліпіну, наступним етапом нашої роботи, явилось вивчення шляхів корекції вмісту кардіоліпіну в клітинах та тканинах старих тварин при дії інгібіторів кислої сфінгомієлінази (іміпраміну і золедронової кислоти) та інгібітору нейтральної сфінгомієлінази – N-ацетилцистеїну [295, 296].

Низкою попередніх досліджень було продемонстрована можливість модуляції вікових змін обміну сфінголіпідів в різних тканинах старіючого організму за допомогою іміпраміну [143] або N-ацетилцистеїну [293, 294]. Введення іміпраміну значно коригувало вміст кераміду в тканинах старих щурів лінії Вістар, наближаючи баланс керамід/сфінгомієлін до показників молодих тварин [142, 143]. Так, раніше в нашої лабораторії було встановлено збільшення вмісту сфінгомієліну і зниження співвідношення керамід/сфінгомієлін в гіпокампі (на 39 %), корі мозку (на 29 %), серці (на 19 %) і печінці (на 13 %) старих щурів після 14-денного введення тваринам меліпраміну (препарату, діючою речовиною якого, є іміпрамін) [143]. Зниження співвідношення рівня кераміду до сфінгомієліну в клітинах є важливим показником підвищення активності сфінгомієліназ. Вважається, що підвищення співвідношення керамід/сфінгомієлін в клітинах у процесі старіння організму, збільшує чутливість клітин до апоптотичних сигналів і може індукувати загибель клітин шляхом апоптозу або некрозу [153]. Значення сфінгомієліназ у змінах рівня сфінголіпідів, викликаних іміпраміном, можна підтвердити дією специфічного інгібітору кислої сфінгомієлінази – золедронової кислоти. Так, ін'єкції золедронової кислоти старим щурам викликали зниження вмісту кераміду, накопичення

сфінгомієліну та зменшення співвідношення церамід/сфінгомієлін в сироватці крові, печінці, серці і литковому м'язі 24-місячних щурів [142]. При цьому найбільш виражений ефект золедронової кислоти спостерігався в серці старих тварин: вміст сфінгомієліну підвищувався на 47 %, в той час як рівень цераміду знижувався майже в 2 рази, в порівнянні з контрольними тваринами [142].

У даній роботі встановлено, що рівень кардіоліпіну, знижений в серці і печінці 24-місячних щурів, збільшувався в цих тканинах при дії іміпраміну, золедронової кислоти або N-ацетилцистеїну (Рис. 3.22). Причому, в печінці іміпрамін збільшував рівень кардіоліпіну на 38 %, а золедроновая кислота на 28 % порівняно з вмістом цього ліпиду в печінці молодих тварин (Рис. 3.22).

У той же час в серці, обидва препарати приводили до збільшення рівня кардіоліпіну на 29 % (у щурів які отримували іміпрамін) і на 33 % (при дії золедронової кислоти) в порівнянні з контрольними щурами 24-місячного віку. Однак якщо іміпрамін і золедронат в печінці викликали значне збільшення вмісту кардіоліпіну, як в порівнянні зі старими, так і з 3-місячними тваринами, то в серці обрані дози інгібіторів кислої сфінгомієлінази виявилися недостатніми для відновлення вмісту кардіоліпіну до рівня 3-місячних щурів, хоча і підвищували вміст кардіоліпіну в порівнянні з 24-місячними щурами. Можна припустити, що іміпрамін і золедронат металізуються в печінці, в зв'язку, з чим концентрація і ефекти цих препаратів в тканинах печінки виявилися вищими, ніж в серці. При цьому інгібітор нейтральної сфінгомієлінази – N-ацетилцистеїн в серці і печінці відновлював рівень кардіоліпіну до рівня молодих щурів (Рис. 3.22). У корі мозку жоден з застосованих інгібіторів кислої сфінгомієлінази не впливав на рівень кардіоліпіну, тоді як пригнічення активності нейтральної сфінгомієлінази дією N-ацетилцистеїну значно підвищувало вміст кардіоліпіну. Можна припустити, що ефекти N-ацетилцистеїну на рівень кардіоліпіну в серці і печінці старих щурів частково обумовлені його антиоксидантними властивостями, але в той же час показано, що в

мітохондріях присутня мітохондрія-асоційована нейтральна сфінгомеліназа [297], тому спостережувані ефекти можуть бути викликані дією N-ацетилцистеїну саме на метаболізм сфінголіпідів в мітохондріях. Крім того, раніше було показано, що ін'єкції іміпраміну старим щурам протягом 14 днів ефективно знижували рівень цераміду в сироватці крові і м'язах, але не в гіпокампі і корі мозку цих тварин [143].

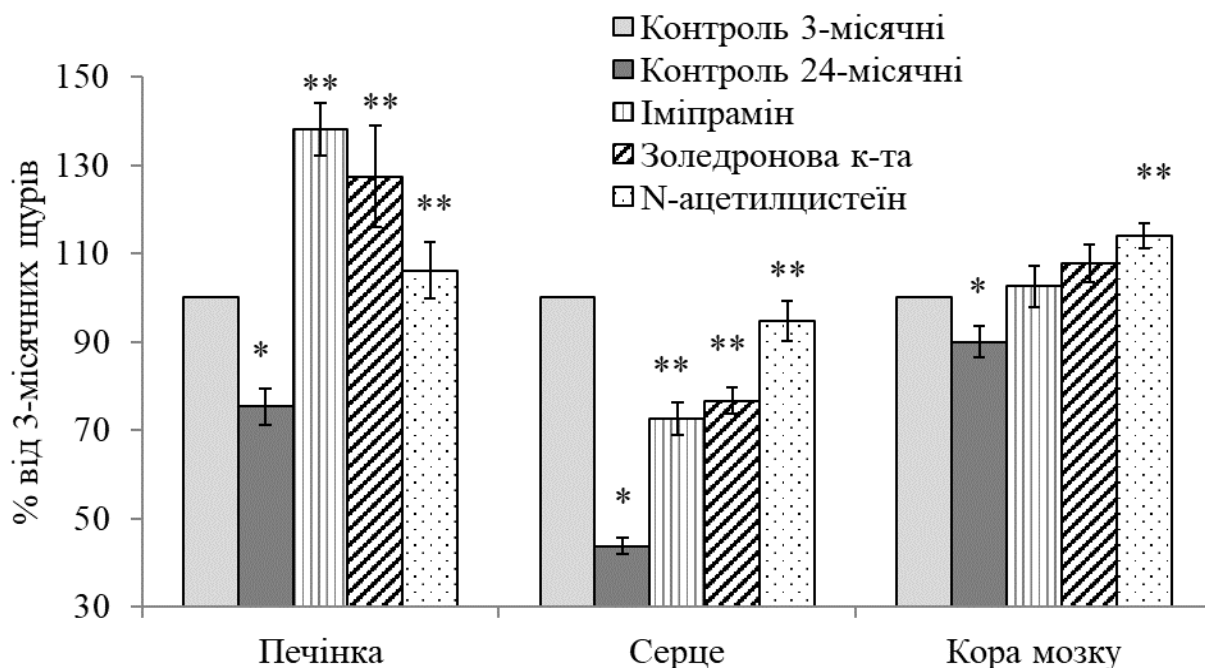


Рис. 3.22 Вплив інгібіторів нейтральної та кислої сфінгомеліназ на вміст кардіоліпіну в тканинах 24-місячних щурів

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Контроль 3-місячні»; \*\* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Контроль 24-місячні». Данні представлені у % від 3-місячних тварин

Встановлено, що в тканинах мозку основний внесок в збільшення рівня цераміду досягається саме за рахунок дії нейтральної сфінгомелінази, тоді як кисла сфінгомеліназа бере участь у формуванні пулу цераміду в периферичних тканинах [293, 298, 299, 300]. Таким чином, значний ефект N-ацетилцистеїну на рівень кардіоліпіну в мозку в порівнянні з дією інгібіторів кислої сфінгомелінази може пояснюватися тканинної специфічністю сфінгомелінази.

У той же час, збільшення вмісту кардіоліпіну при дії інгібіторів кислої сфінгомелінази супроводжувалися зниженням рівня фосфатидної кислоти в печінці та серці старих щурів, у порівнянні з контрольними тваринами (Рис. 3.23). Зниження рівня фосфатидної кислоти на тлі збільшення вмісту кардіоліпіну ймовірно пов'язано з активізацією використання фосфатидної кислоти в синтезі фосфоліпідів. Тоді як відсутність змін фосфатидної кислоти в серці і мозку при дії N-ацетилцистеїну передбачає збільшення вмісту кардіоліпіну за рахунок блокування шляхів його деградації. У той же час, в мозку старих щурів при дії іміпраміну і золедронової кислоти спостерігається зниження вмісту фосфатидної кислоти (на 34 % і на 42 % відповідно), яке супроводжується не значним збільшенням рівня кардіоліпіну (Рис. 3.23). Можна припустити, що інгібітори кислої сфінгомелінази в мозку старих тварин прискорюють перетворення фосфатидної кислоти в фосфоліпіди.

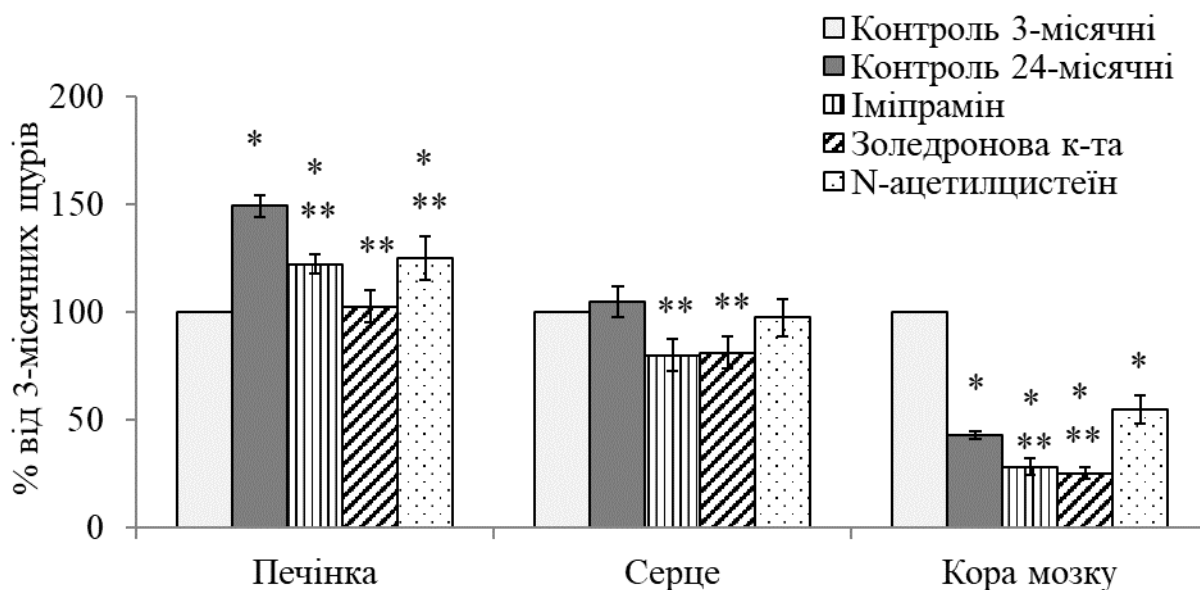


Рис. 3.23 Вплив інгібіторів нейтральної та кислої сфінгомелінази на вміст фосфатидної кислоти в тканинах 24-місячних щурів

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Контроль 3-місячні»; \*\* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Контроль 24-місячні». Данні представлені у % від 3-місячних тварин

Показано, що накопичення кераміду в мембранах клітин з віком призводить до латентної активації керамід-залежних сигнальних каскадів, відповідальних зокрема за запальні процеси і активацію імунної системи, що в свою чергу може провокувати хронічні запальні процеси в тканинах [5, 125, 153, 154]. Введенням інгібіторів нейтральної та кислої груп сфінгомеліназ встановлено, що зниження вмісту кераміду, призводить до збільшення вмісту кардіоліпіну в досліджених тканинах старих щурів. Крім того, відсутність ефекту іміпраміну і золедроновної кислоти на вміст кардіоліпіну в мозку старих щурів, може бути обумовлено тканинної специфічністю дії кислої сфінгомелінази.

Низкою дослідників показана здатність N-ацетилцистеїну пригнічувати активність нейтральної сфінгомелінази, і знижувати підвищений гіпоксією рівень кераміду в клітинах PC12 [298], і мозку старих щурів [293]. У пізньому постнатальному онтогенезі в гіпокампі і неокортексі щурів встановлена підвищена активність нейтральної сфінгомелінази і акумуляція кераміду [293], тоді як введення N-ацетилцистеїну цим тваринам призводило до зниження надмірної генерації кераміду за рахунок пригнічення активності нейтральної сфінгомелінази і поліпшенню когнітивних здібностей старих щурів [293]. З огляду на те, що під дією N-ацетилцистеїну в мозку рівень кардіоліпіну збільшувався (Рис. 3.22), а зниження вмісту кардіоліпіну в мозку при дії C16-кераміду призводило до появи депресивно-подібної поведінки 3-місячних щурів (див. розділ 3.2.2.2), в подальших дослідженнях для вивчення взаємозв'язку поведінки тварин і вмісту цього ліпиду старим щурам вводили N-ацетилцистеїн шляхом інтраназального введення (Рис. 3.24). Встановлено, що введення N-ацетилцистеїну старим 24-місячним щурам протягом 14 днів шляхом інтраназального вприскування призводило до підвищення рівня кардіоліпіну (на 86 %) та зменшенню відношення керамід/сфінгомелінів 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 (Рис. 3.24).

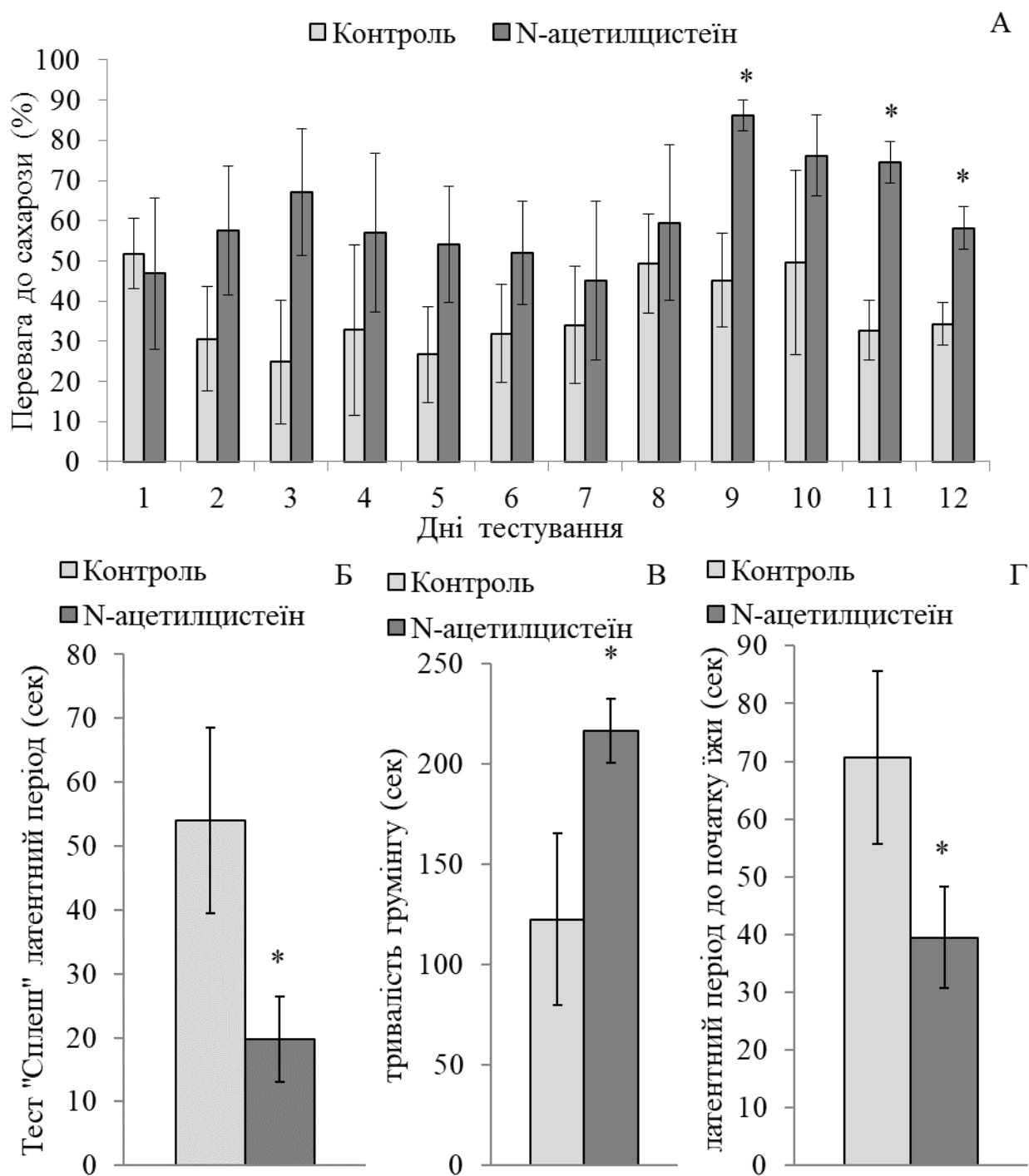


Рис. 3.24 Вплив N-ацетилцистеїну на особливості поведінки щурів 24-місячного віку в тесті на перевагу до сахарози (А), «Сплеш-тесті» (Б та В) та при годуванні в незнайомій обстановці (Г)

Примітка. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з групою «Контроль»

Встановлено що, вже після 9 введення N-ацетилцистеїну щури дослідної групи починали віддавати перевагу солодкому розчину сахарози (Рис. 3.24 А), значно зменшувався латентний період перед початком грумінгових реакцій які складались в очисних реакцій та вмиваній (Рис. 3.24 Б), збільшувався загальний час догляду за собою (Рис. 3.24 В). В тесті годування щурів в незнайомій обстановці дослідні тварини скоріше адаптувалися в новій клітці, та раніше починали приймати їжу (Рис. 3.24 Г), що може свідчити про зменшення рівня їхньої тривожності. Раніше при дослідженні поведінки щурів старого (24-місячного) та дуже старого (30-32-місячного) віку були виявлені ознаки депресивно-подібної поведінки в щурів цих вікових груп (Рис. 3.19).

Одним з факторів ризику розвитку депресивно-подібних станів є вплив стресу. Відомо, що значний депресивно-подібний розлад поведінки у піддослідних тварин досягається при пред'явленні їм різних непередбачуваних стресорів протягом тривалого часу. Крім того, показано, що в патології депресивно-подібних станів задіяний ліпідний шлях, який активується окисним стресом, запаленням, а також психосоціальним стресом [301]. Збільшення цераміду в мозку при введенні С16-цераміду безпосередньо в гіпокамп імітує зміни, що виникають при стресі [150]. У той же час, введення N-ацетилцистеїну старим тваринам призводило до зниження рівня цераміду, пригнічення активності нейтральної сфінгомієлінази і поліпшення когнітивних функцій у 24-місячних щурів [302].

У нашій роботі встановлено, що інтраназальне введення N-ацетилцистеїну знижувало вміст кардіоліпіну і співвідношення церамід/сфінгомієлін, а також нівелювало ознаки депресивно-подібної поведінки старих щурів (див. розділ 3.2.2.2), посилюючи інстинкти догляду за собою, частоту грумінгових реакцій і знижуючи тривожність цих тварин. Зменшення депресивно-подібних симптомів при введенні N-ацетилцистеїну старим тваринам виражається також у зниженні ангедонії та надання



переваги солодкому розчину ніж воді. Таким чином отримані данні є строгим доказом того, що депресивно-подібна поведінка пов'язана із рівнями цераміду та кардіоліпіну, а регулювання вмісту цих сигнальних ліпідів дозволяє коригувати вік-асоційовані депресивно-подібні стани та прояви тривожності.

### **3.4 Вплив екзогенного кардіоліпіну на чутливість клітин 24-місячних щурів до інсуліну**

В даній роботі встановлено, що індукція накопичення ендогенних церамідів шляхом збільшення вмісту насичених жирів раціону, введення щурам етанолу або доксорубіцину, та додавання до середовища інкубації гепатоцитів екзогенних церамідів, доксорубіцину, пальмітинової кислоти призводило до зниження вмісту кардіоліпіну в досліджених клітинах (див. розділи 3.2.1 та 3.2.2.1). В той же час, обмеження калорійності раціону щурів протягом життя, або введення інгібіторів різних етапів метаболізму цераміду запобігало зниженню при старінні вмісту кардіоліпіну в клітинах печінки, серця та кори мозку (див. розділи 3.2.1 та 3.3). Крім того, зниження рівня кардіоліпіну в гепатоцитах щурів передувало зниженню життєздатності цих клітин (див. розділ 3.2.2.1), а зменшення вмісту кардіоліпіну в гіпокампі, викликане введенням С16-цераміду, супроводжувалось появою депресивно-подібних розладів поведінки щурів, що також може бути обумовлено порушенням функціонування клітин мозку (див. розділ 3.2.2.2). Отримані результати вказують на взаємозв'язок між рівнями кардіоліпіну, цераміду та функціонуванням тканин.

Відомо, що при старінні в клітинах накопичується церамід, що багатьма дослідниками вважається причиною розвитку метаболічних захворювань, діабету 2 типу та нейродегенерацій, внаслідок розвитку резистентності клітин-цілей до дії інсуліну [10, 11, 13, 136, 271]. Раніше в нашої лабораторії було встановлено, що моделювання підвищеного вмісту

цераміду в гепатоцитах, корі мозку або діафрагмі призводить до порушення інсулін-залежного поглинання глюкози та утворення глікогену [10, 13, 15]. Тоді як введення до середовища інкубації клітин модуляторів обміну сфінголіпідів, які призводять до зниження вмісту цераміду, відновлювало чутливість клітин до інсуліну та стимулювало процеси поглинання глюкози клітинами [11, 13]. Таким чином модулюючи обмін сфінголіпідів в клітинах вдавалось відновлювати порушений із віком або експериментально функціональний стан клітин [11, 13]. Враховуючи встановлену здатність відновлювати чутливість клітин до гормональних стимулів шляхом зниження вмісту цераміду, а також те що накопичення цераміду призводило до порушення метаболізму кардіоліпіну (див. розділ 3.2.2.1) в клітинах наступним етапом нашої роботи явилось вивчення впливу екзогенного кардіоліпіну на функціональний стан клітин та тканин 24-місячних щурів.

На теперішній час мітохондріальна дисфункція вважається важливим фактором розвитку багатьох патологій при діабеті [223, 224, 303, 304, 305]. В той же час порушення функції мітохондрій при діабеті, ожирінні, метаболічному синдромі і інших метаболічних захворюваннях, ряд дослідників пов'язують з окисним пошкодженням кардіоліпіну та зниженням вмісту цього фосфоліпиду [303, 304, 305]. Дослідження стрептозоцин-індукованого діабету у мишей FVB, за допомогою аналізу Вестерн-блот виявили, що причиною зниження рівня кардіоліпіну явилось пригнічення активності кардіоліпінсинтази, ферменту, що забезпечує останній етап синтезу кардіоліпіну з фосфатидилгліцеролу [91]. Вважається, що терапевтичні заходи спрямовані на збереження вмісту фосфоліпідів та білків внутрішньої мембрани мітохондрій, і зокрема кардіоліпіну, можуть забезпечити протекторний вплив при розвитку діабету [303].

В нашої роботі екзогенний кардіоліпін 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 кардіоліпіну до

середовища культивуації гепатоцитів, корі мозку або литкового м'яза призводило до збільшення поглинання клітинами міченої глюкози та підсилювала синтез глікогену (Рис. 3.25). 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 [10]. Внесення до середовища інкубації гепатоцитів, кори мозку та литкового м'яза екзогенного кардіоліпіна не тільки збільшувало пасивне поглинання клітинами глюкози, але й призводило до значного зростання інсулін-стимульованого поглинання міченої глюкози дослідженими клітинами та тканинами (Рис. 3.25). Крім того, стимуляція інсуліном гепатоцитів та литкового м'язу попередньо інкубованих з екзогенним кардіоліпіном призводила до підвищення використання міченої глюкози в синтезі глікогену (Рис. 3.25).

Виявлено, що резистентність клітин до інсуліну виникає, коли інсулін-чутливі тканини, в основному, скелетні м'язи, жирова тканина і печінка, втрачають здатність адекватно реагувати на цей гормон [306]. Причому на клітинному рівні в розвитку інсулін-резистентності ключову роль відіграє порушення функціонування мітохондрій. Встановлено, що при діабеті та розвитку резистентності клітин до дії інсуліну спостерігається зниження активності комплексу респіраторного ланцюга, мутації або втрата ділянок мітохондріальної ДНК, зниження біоенергетичної ємності мітохондрій та пригнічення експресії генів, залучених в біогенез цих органел [307, 308]. Вважається, що патологічні процеси, які розвиваються при діабеті та метаболічному синдромі пов'язані з надмірної генерацією активних форм кисню в мітохондріях. В той же час, кардіоліпін 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 [30, 31, 34].

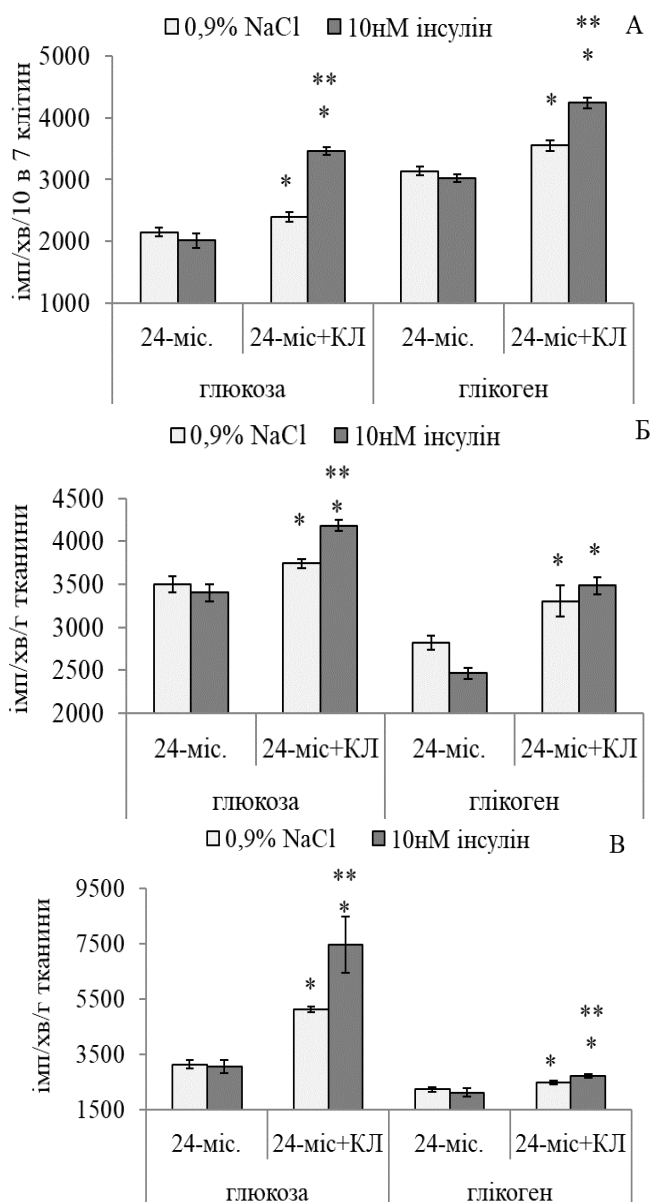


Рис. 3.25 Вплив екзогенного кардіоліпіну на індуковане інсуліном поглинання 2-D-[ $^3\text{H}$ ]-глюкози та утворення D-[U $^{14}\text{C}$ ]-глікогену у гепатоцитах (А), корі мозку (Б) та литкового м'яза (В) старих щурів

Примітки:

1. 24-міс. – клітини 24-місячних щурів; 24-міс+КЛ – клітини 24-місячних щурів, що були культивовані у присутності екзогенного кардіоліпіну;
2. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з відповідним контролем 24-місячних щурів; \*\* –  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем до інсуліну (0,9 % NaCl)

При дослідженні діабетичного стану в мишей, вже у перші дні введення стрептозоцину в міокарді спостерігалась втрата багатьох молекулярних видів кардіоліпіну та ремоделювання решти молекулярних молекул цього ліпиду, що за 6 тижнів приводило до критичного зниження вмісту кардіоліпіну та розвитку діабетичної кардіоміопатії [305]. При дослідженні мітохондрій генетично змінених дріжджів (в клітинах яких не утворюється кардіоліпін) встановлено, що відсутність кардіоліпіну в клітинах викликає зниження мітохондріальних мембранних потенціалів [309] та гальмування трансляції білкових компонентів електронтранспортного ланцюга [79]. Аналогічні порушення ультраструктури та функції мітохондрій спостерігались у нематоди *Caenorhabditis elegans* з дефіцитом кардіоліпіну внаслідок відсутності кардіоліпінсинтази [310].

В той же час введення мишам з моделлю хвороби Альцгеймера (миши APP/PS1) липосом, що містили фосфатидну кислоту або кардіоліпін, приводило до суттєвого зниження амілоїду A $\beta$  у периферичній крові та мозку [311]. Разом із цим на мітохондріях серця старих щурів продемонстроване відновлення активності цитохром-оксидази до рівня контрольних 3-місячних тварин шляхом додавання липосом з екзогенним кардіоліпіном [103]. Роботами Робінсона та співавторів [312], було показано, що саме екзогенно доданий кардіоліпін, але не інші фосфоліпіди, виявився ефективним при відновленні активності цитохром оксидази. Крім того, у дослідях *in vitro* встановлено, що екзогенний кардіоліпін або фосфатидилгліцерол здатен проникати у внутрішню мембрану мітохондрій головного мозку щурів та попереджати вивільнення цитохрому c, запобігаючи активації сигналів в апоптозному каскаді [39].

Вважається, що одним з механізмів порушення поглинання клітинами глюкози при зниженні вмісту кардіоліпіна може бути зниження активності респіраторного ланцюга мітохондрій і зменшення вироблення АТФ, що в свою чергу викликає порушення роботи транспортерів глюкози, яким для нормального функціонування необхідна енергія АТФ [313]. Так на

ендотеліальних клітинах мозку було показано що зниження вмісту кардіоліпіну призводить до збільшення експресії транспортера глюкози GLUT-1, що автори пов'язують з компенсаторним механізмом в клітинах [313]. Таким чином, механізм взаємозв'язку між зниженням кардіоліпіну і поглинанням глюкози та розвитком інсулінорезистентності може полягати в дефіциті енергії АТФ необхідної для роботи транспортерів глюкози. Це припущення підтверджується встановленим в нашої роботі збільшенням не стимульованого інсуліном поглинання глюкози клітинами при введенні екзогенного кардіоліпіна до середовища культивації клітин та тканин. Для роботи інсулін-залежного транспортера глюкози GLUT-4 також необхідна енергія АТФ, продукція якої значно зменшується при старінні. Можна припустити, що додавання екзогенного кардіоліпіну, яке нормалізує роботу мітохондрій та утворення АТФ, також сприяє роботі GLUT-4, та відновлює інсулін-стимульоване поглинання глюкози в клітинах старих тварин.

В той же час відомо, що розвиток резистентності тканин печінки щурів до інсуліну в умовах висококалорійної дієти супроводжується підсиленням експресії генів синтезу керамідів у цьому органі, підвищенням активності сфінгомієлінази, зростанням перекісного окиснення ліпідів, а також збільшенням вмісту кераміду в сироватці крові [314]. Крім того, показано, що в печінці та м'язах щурів, резистентних до інсуліну, рівень кераміду був значно вищим, ніж в нормальних щурів [315]. Вважається, що механізм впливу кераміду на розвиток інсулінрезистентності полягає в здатності цих біологічно активних ліпідів пригнічувати ряд молекул, що беруть участь в передачі гормональних сигналів в клітинах, таких як Akt/протеїнкіназа В і фосфоліпаза Д [1, 200, 316, 317]. Разом із цим, Novgorodov та співавтори [223] показали, що при діабеті збільшується рівень дигідроцерамідів у мітохондріях серця і припустили, що рівень кераміду в цих органелах при діабеті регулюється мітохондріальною нейтральною церамідазою. В той же час відомо, що керамід може впливати на функціонування мітохондрій, пригнічуючи дихальну активність респіраторного ланцюга, і регулюючи

проникність зовнішньої мембрани мітохондрій для цитохрому с [19, 21, 27]. Ці дані дозволяють припустити, що збільшення концентрації внутрішньоклітинних керамідів викликає порушення сигналізу інсуліну, шляхом впливу на мітохондрії, тоді як збільшення вмісту кардіоліпіну в мітохондріях відновлює функціонування цих органел і нівелює ефекти накопичення кераміду в клітинах.

Для підтвердження цього припущення у наступній серії експериментів ми досліджували вплив екзогенного кардіоліпіну на інсулін-стимульоване поглинання глюкози в умовах моделювання підвищеного рівня кераміду в клітинах молодих тварин [318]. Підвищення рівня кераміду в гепатоцитах 3-місячних щурів викликали інкубацією в присутності цитотоксичного препарату доксорубіцину або С16-кераміду, після чого в середовище культивування клітин дослідної групи вводили екзогенний кардіоліпін і продовжували інкубацію ще протягом години (Рис.3.26).

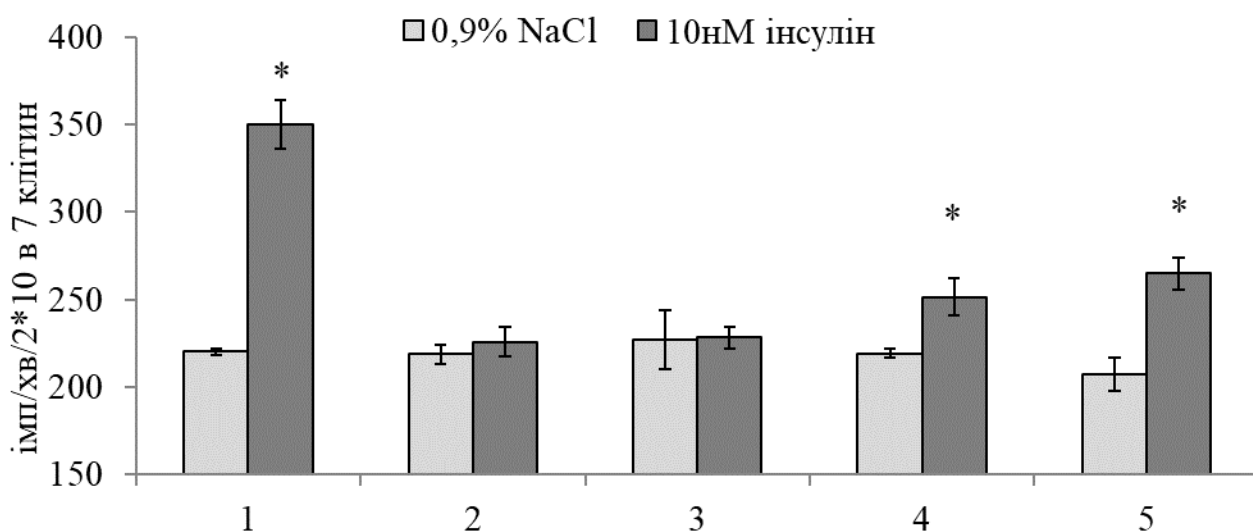


Рис. 3.26 Вплив екзогенного кардіоліпіну на інсулін-стимульоване поглинання 2-D-[<sup>3</sup>H]-глюкози клітинами печінки 3-місячних щурів

Примітки:

1. 1 – Контроль; 2 – Доксорубіцин; 3 – С16-керамід; 4 – Доксорубіцин+Кардіоліпін; 5 – С16-керамід+Кардіоліпін;

2. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем до інсуліну (0,9 % NaCl)

Після завершення інкубації досліджували поглинання клітинами міченої глюкози при дії інсуліну. 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 ліпосом з кардіоліпіном значно підсилює інсулін-стимульоване поглинання глюкози клітинами (Рис. 3.26).

Таким чином, встановлено збільшення поглинання глюкози і синтезу глікогену клітинами і тканинами старих щурів при введенні в середовище їх інкубації екзогенного кардіоліпіну. Через це, значне збільшення інсулін-стимульованого поглинання глюкози і синтезу глікогену в клітинах і тканинах при дії кардіоліпіну може характеризувати відновлення функціонального стану клітин старих тварин і підвищення їх чутливості до інсуліну. Отже, отримані данні дозволяють припустити, що сигнальні функції цераміду можуть бути опосередковані через його ефекти на метаболізм кардіоліпіну, зміни рівня якого в свою чергу визначають функціональний стан клітин і тканин у процесі онтогенезу. А, підвищення поглинання глюкози в гепатоцитах 3-місячних щурів при дії екзогенного кардіоліпіну на тлі індукції накопичення цераміду, дією доксорубіцину або С16-цераміду підтверджує це припущення.

### **Висновки до розділу 3**

В нашій роботі вікове зниження вмісту кардіоліпіну спостерігалось в серці, печінці, корі мозку та гіпокампі щурів лінії Вістар. Було встановлено, що в тканинах серця та печінки щурів вікові зміни вмісту кардіоліпіну спостерігаються у 12-місячному віці. В той же час, в корі мозку та гіпокампі зниження рівня кардіоліпіну виявлялось лише після 24-місячного віку у порівнянні з вмістом кардіоліпіну у 3-місячних щурів. Таким чином встановлено, що зниження вмісту кардіоліпіну спостерігається в усіх



досліджених тканинах, але вік появи цих змін відрізняється для кожної тканини.

В той же час, індукція накопичення ендогенних керамідів шляхом введення молодим щурам доксорубіцину або додавання цього препарату до середовища інкубації гепатоцитів призводило до зниження вмісту кардіоліпіну в серці та клітинах печінки. У той же час, інгібітор синтезу кераміду – міріоцін попереджав зниження рівня кардіоліпіну, викликане доксорубіцином у гепатоцитах 3-місячних щурів.

Збільшення вмісту насичених жирів в дієті експериментальних тварин, викликало зниження вмісту кардіоліпіну в тканинах серця і печінки. Подібні результати були отримані в умовах *in vitro* при інкубації гепатоцитів з пальмітиновою кислотою: вже через 2 години інкубації клітин спостерігалось значне зниження вмісту кардіоліпіну та накопичення фосфатидної кислоти. А після 3-годинної інкубації падіння рівня кардіоліпіну супроводжувалось зниженням життєздатності гепатоцитів.

Внесення до середовища інкубації клітин та тканин синтетичного коротколанцюгового С2-кераміду, або довголанцюгових С16-, та С18-керамідів призводило до порушення метаболізму кардіоліпіну і зниження життєздатності клітин. Крім того встановлено, що короткочасна перфузія серця 3-місячних щурів С16-керамідом призвело до накопичення кераміду та істотному зниженню вмісту кардіоліпіну в серцевій м'язовій тканині.

Порушення обміну сфінго- і гліцероліпідів, викликаних етанолом, можна коригувати додаванням до харчового раціону кверцетину і поліненасичених жирних кислот риб'ячого жиру на тлі етанолу. Крім того, попередити вікове зниження вмісту кардіоліпіну в серці, печінці та мозку 24-місячних щурів вдавалося за допомогою утримання тварин на калорійно-обмеженому раціоні.

Показано також, що збільшення вмісту кераміду в корі мозку і гіпокампі молодих тварин за допомогою інкубації цих тканин в присутності

екзогенного С16-цераміду або шляхом внутрішньоназального введення пальмітоїл-цераміду призводило до зниження рівня кардіоліпіну в гіпокампі. Збільшення вмісту цераміду і зниження рівня кардіоліпіну в гіпокампі молодих щурів сприяло появі депресивно-подібної поведінки: з'являлася ангедонія, зменшувалася частота грумінгу і реакції догляду за собою, збільшувалася тривожність. В той же час, введення старим 24-місячним щурам N-ацетилцистеїну призводило до підвищення рівня кардіоліпіну та зникненню ознак депресивно-подібної поведінки:

Модулювання вмісту цераміду в серці та печінці 24-місячних щурів за допомогою інгібіторів ферментів, які каталізують створення цераміду – іміпраміну та золедронові кислоти дозволили нормалізувати знижений рівень кардіоліпіну в цих тканинах. Крім того, введення інгібітору нейтральної сфінгомієлінази N-ацетилцистеїну 24-місячним щурам підвищувало вміст кардіоліпіну в мозку.

В нашій роботі встановлена залежність функціонального стану клітин і тканин від вмісту кардіоліпіну. Так показано, що введення екзогенного кардіоліпіну до ізольованих гепатоцитів, м'язової тканини і кори мозку 24-місячних щурів або до гепатоцитів 3-місячних щурів, попередньо інкубованих з С16-церамідом або доксорубіцином, призводило до збільшення базального та інсулін-стимульованого поглинання клітинами міченої глюкози та підсилювало синтез глікогену.

Таким чином, в даній роботі встановлено щільний взаємозв'язок між накопиченням цераміду у старості та зниженням рівня кардіоліпіну в серці, печінці та мозку щурів. Встановлена залежність функціонального стану клітин і тканин, та поведінки щурів від вмісту кардіоліпіну, а також продемонстровані можливості корекції метаболізму кардіоліпіну за допомогою аліментарних факторів або модуляторів обміну сфінголіпідів.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено [94, 95, 142, 143, 148, 156, 163, 202, 203, 219, 220, 221, 228, 229, 249, 250, 255, 256, 257, 258, 295, 296, 318].

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі встановлено зниження рівня кардіоліпіну в серці, печінці та мозку щурів при старінні або при експериментальному накопиченні цераміду в клітинах. Крім того, зменшення вмісту кардіоліпіну 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 кардіоліпіну в мозку 24-місячних щурів шляхом введення N-ацетилцистеїну, який інгібує продукцію церамідів, призводило до корекції порушень у поведінці щурів. Додавання екзогенного кардіоліпіну 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.

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

2. Встановлено зниження вмісту кардіоліпіну 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 цераміду з віком, запобігало зниженню рівня кардіоліпіну в серці, печінці та корі мозку 24-місячних щурів, зберігаючи вміст цього ліпіду на рівні 3-місячних тварин.

3. Встановлено зниження вмісту кардіоліпіну в м'язовій тканині серця 3-місячних щурів після перфузії цього органу C16-церамідом та в гепатоцитах молодих щурів при культивуванні клітин у присутності екзогенних C2-, C16-, C18-церамідів, або препаратів які індукують накопичення цераміду – пальмітинової кислоти та доксорубіцину. В той же час інгібітор серинпальмітоїлтрансферази – міріюцин, попереджуючий накопичення цераміду, нівелював ефекти доксорубіцину на гепатоцити, знижуючи рівень цераміду та нормалізував вміст кардіоліпіну в клітинах молодих щурів.

4. Зростання вмісту цераміду в гіпокампі 3-місячних щурів шляхом інтраназального введення C16-цераміду приводило до зниження вмісту кардіоліпіну 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 кардіоліпіну в мозку молодих тварин були подібні до таких у інтактних щурів 24-місячного віку.

5. Зниження вмісту цераміду в мозку 24-місячних щурів за допомогою інтраназального введення інгібітору нейтральної сфінгомієлінази – N-ацетилцистеїну приводила до збільшення вмісту кардіоліпіну 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 сфінгомієлінази – іміпраміну або золедронової кислоти запобігало зниженню вмісту кардіоліпіну у серці та печінці 24-місячних щурів. Внутрішньошлункове введення інгібітору нейтральної сфінгомієлінази – N-ацетилцистеїну, дозволяло нормалізувати знижений рівень кардіоліпіну в печінці, серці та мозку 24-місячних тварин до такого в тканинах 3-місячних щурів.

7. Внесення екзогенного кардіоліпіну 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Summers SA. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res.* 2006 Jan;45(1):42–72.
2. Kasumov T, Li L, Li M, Gulshan K, Kirwan JP, Liu X, et al. Ceramide as a mediator of non-alcoholic Fatty liver disease and associated atherosclerosis. *PloS ONE.* 2015;10(5):e0126910.
3. Li P-L, Zhang Y. Cross talk between ceramide and redox signaling: implications for endothelial dysfunction and renal disease. *Handb Exp Pharmacol.* 2013;(216):171–97.
4. Kornhuber J, Rhein C, Müller CP, Mühle C. Secretory sphingomyelinase in health and disease. *Biol Chem.* 2015 Jun;396(6–7):707–36.
5. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid bioenerge: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Feb;9(2):139–50.
6. Pavoine C, Pecker F. Sphingomyelinases: their regulation and roles in cardiovascular pathophysiology. *Cardiovasc Res.* 2009 May 1;82(2):175–83.
7. Liu X, Zeidan YH, Elojeimy S, Holman DH, El-Zawahry AM, Guo G-W, et al. Involvement of sphingolipids in apoptin-induced cell killing. *Mol Ther.* 2006 Nov;14(5):627–36.
8. Tirodkar TS, Voelkel-Johnson C. Sphingolipids in apoptosis. *Exp Oncol.* 2012 Oct;34(3):231–42.
9. Babenko NA, Semenova YA. Effects of long-term fish oil-enriched diet on the sphingolipid metabolism in brain of old rats. *Exp Gerontol.* 2010 May;45(5):375–80.
10. Babenko NA, Kharchenko VS. Ceramides inhibit phospholipase D-dependent insulin signaling in liver cells of old rats. *Biochemistry Mosc.* 2012 Feb;77(2):180–6.
11. Babenko NA, Kharchenko VS. Modulation of insulin sensitivity of

hepatocytes by the pharmacological downregulation of phospholipase D. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:794838.

12. Babenko NA, Hassouneh LKM, Kharchenko VS, Garkavenko VV. Vitamin E prevents the age-dependent and palmitate-induced disturbances of sphingolipid turnover in liver cells. *Age (Dordr)*. 2012 Aug;34(4):905–15.

13. Babenko NA, Kharchenko VS. Effects of inhibitors of key enzymes of sphingolipid metabolism on insulin-induced glucose uptake and glycogen synthesis in liver cells of old rats. *Biochemistry Mosc*. 2015 Jan;80(1):104–12.

14. Babenko NA, Shakhova EG. Effects of *Chamomilla recutita* flavonoids on age-related liver sphingolipid turnover in rats. *Exp Gerontol*. 2006 Jan;41(1):32–9.

15. Babenko NA, Kharchenko VS. Age-related changes in the phospholipase D-dependent signal pathway of insulin in the rat neocortex. *Neurophysiology*. 2013 Mar 1;45(2):120–7.

16. Mancuso DJ, Kotzbauer P, Wozniak DF, Sims HF, Jenkins CM, Guan S, et al. Genetic ablation of calcium-independent phospholipase A2{gamma} leads to alterations in hippocampal cardiolipin content and molecular species distribution, mitochondrial degeneration, autophagy, and cognitive dysfunction. *J Biol Chem*. 2009 Dec 18;284(51):35632–44.

17. Puente-Maestu L, Pérez-Parra J, Godoy R, Moreno N, Tejedor A, González-Aragoneses F, et al. Abnormal mitochondrial function in locomotor and respiratory muscles of COPD patients. *Eur Respir J*. 2009 May;33(5):1045–52.

18. Chen Q, Ross T, Hu Y, Lesnefsky EJ. Blockade of electron transport at the onset of reperfusion decreases cardiac injury in aged hearts by protecting the inner mitochondrial membrane. *J Aging Res*. 2012;2012:753949.

19. Siskind LJ. Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *J Bioenerg Biomembr*. 2005 Jun;37(3):143–53.

20. Siskind LJ, Kolesnick RN, Colombini M. Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion*. 2006 Jun;6(3):118–25.

21. García-Ruiz C, Colell A, Marí M, Morales A, Fernández-Checa JC. Direct

effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem*. 1997 Apr 25;272(17):11369–77.

22. Novgorodov SA, Gudz TI, Obeid LM. Long-chain ceramide is a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem*. 2008 Sep 5;283(36):24707–17.

23. Novgorodov SA, Wu BX, Gudz TI, Bielawski J, Ovchinnikova TV, Hannun YA, et al. Novel pathway of ceramide production in mitochondria: thioesterase and neutral ceramidase produce ceramide from sphingosine and acyl-CoA. *J Biol Chem*. 2011 Jul 15;286(28):25352–62.

24. Kujjo LL, Perez GI. Ceramide and mitochondrial function in aging oocytes: joggling a new hypothesis and old players. *Reproduction*. 2012 Jan 1;143(1):1–10.

25. Patwardhan GA, Beverly LJ, Siskind LJ. Sphingolipids and mitochondrial apoptosis. *J Bioenerg Biomembr*. 2016 Apr;48(2):153–68.

26. Birbes H, El Bawab S, Hannun YA, Obeid LM. Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis. *FASEB J*. 2001 Dec;15(14):2669–79.

27. Stiban J, Caputo L, Colombini M. Ceramide synthesis in the endoplasmic reticulum can permeabilize mitochondria to proapoptotic proteins. *J Lipid Res*. 2008 Mar;49(3):625–34.

28. Hoch FL. Cardiolipins and biomembrane function. *Biochim Biophys Acta*. 1992 Mar 26;1113(1):71–133.

29. Hatch GM. Regulation of cardiolipin biosynthesis in the heart. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1996 Sep 1;159(2):139–48.

30. Chicco AJ, Sparagna GC. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am J Physiol, Cell Physiol*. 2007 Jan;292(1):C33–44.

31. Claypool SM. Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Oct;1788(10):2059–68.



32. Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Feb 5;99(3):1259–63.
33. Petrosillo G, Ruggiero FM, Paradies G. Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *FASEB J*. 2003 Dec;17(15):2202–8.
34. McMillin JB, Dowhan W. Cardiolipin and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Dec 30;1585(2–3):97–107.
35. Webster J, Jiang JY, Lu B, Xu FY, Taylor WA, Mymin M, et al. On the mechanism of the increase in cardiolipin biosynthesis and resynthesis in hepatocytes during rat liver regeneration. *Biochem J*. 2005 Feb 15;386(Pt 1):137–43.
36. Monteiro-Cardoso VF, Oliveira MM, Melo T, Domingues MRM, Moreira PI, Ferreira E, et al. Cardiolipin profile changes are associated to the early synaptic mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2015;43(4):1375–92.
37. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Federici A, Ruggiero FM. Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circ Res*. 2004 Jan 9;94(1):53–9.
38. Petrosillo G, Fattoretti P, Matera M, Ruggiero FM, Bertoni-Freddari C, Paradies G. Melatonin prevents age-related mitochondrial dysfunction in rat brain via cardiolipin protection. *Rejuvenation Res*. 2008 Oct;11(5):935–43.
39. Piccotti L, Marchetti C, Migliorati G, Roberti R, Corazzi L. Exogenous phospholipids specifically affect transmembrane potential of brain mitochondria and cytochrome C release. *J Biol Chem*. 2002 Apr 5;277(14):12075–81.
40. Buratta M, Castigli E, Sciacaluga M, Pellegrino RM, Spinozzi F, Roberti R, et al. Loss of cardiolipin in palmitate-treated GL15 glioblastoma cells favors cytochrome c release from mitochondria leading to apoptosis. *J Neurochem*. 2008 May;105(3):1019–31.

41. Maguire JJ, Tyurina YY, Mohammadyani D, Kapralov AA, Anthonymuthu TS, Qu F, et al. Known unknowns of cardiolipin signaling: The best is yet to come. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2017 Jan;1862(1):8–24.
42. Nielson JR, Rutter JP. Lipid-mediated signals that regulate mitochondrial biology. *J Biol Chem*. 2018 May 18;293(20):7517–21.
43. Kagan VE, Jiang J, Huang Z, Tyurina YY, Desbourdes C, Cottet-Rousselle C, et al. NDPK-D (NM23-H4)-mediated externalization of cardiolipin enables elimination of depolarized mitochondria by mitophagy. *Cell Death Differ*. 2016;23(7):1140–51.
44. Huang W, Choi W, Hu W, Mi N, Guo Q, Ma M, et al. Crystal structure and biochemical analyses reveal Beclin 1 as a novel membrane binding protein. *Cell Res*. 2012 Mar;22(3):473–89.
45. Chu CT, Ji J, Dagda RK, Jiang JF, Tyurina YY, Kapralov AA, et al. Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat Cell Biol*. 2013 Oct;15(10):1197–205.
46. Moghaddas S, Stoll MSK, Minkler PE, Salomon RG, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Preservation of cardiolipin content during aging in rat heart interfibrillar mitochondria. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2002 Jan;57(1):B22-28.
47. Babenko NA, Shakhova EG. Effects of flavonoids on sphingolipid turnover in the toxin-damaged liver and liver cells. *Lipids Health Dis*. 2008 Jan 28;7:1.
48. Babenko NA, Semenova IA. [Effect of the diet enriched in the polyunsaturated fatty acids of the fish oil on phospholipid turnover and cognitive function of the old rats]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 2008 Dec;94(12):1400–6.
49. Babenko NA, Hassounah LK, Garkavenko VV. Vitamin E Prevents lipogenesis dysregulation in the liver cells at old age. 2012 May 29 [cited 2017 May 20]; Available from: <http://www.webmedcentral.com/>

50. Babenko NA, Semenova IA. [Effect of exogenous phosphatidylserine on cognitive function and hippocampus phospholipid turnover in old rats]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 2009 Nov;95(11):1268–75.
51. Babenko NA, Semenova YA. Sphingolipid turnover in the hippocampus and cognitive dysfunction in alcoholized rats: correction with the help of alimentary n-3 fatty acids. *Neurophysiology*. 2010 Nov 1;42(3):169–74.
52. Mileykovskaya E, Zhang M, Dowhan W. Cardiolipin in energy transducing membranes. *Biochemistry Mosc*. 2005 Feb;70(2):154–8.
53. Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Ruggiero FM. Oxidative stress, mitochondrial bioenergetics, and cardiolipin in aging. *Free Radic Biol Med*. 2010 May 15;48(10):1286–95.
54. Kulik W, van Lenthe H, Stet FS, Houtkooper RH, Kemp H, Stone JE, et al. Bloodspot assay using HPLC-tandem mass spectrometry for detection of Barth syndrome. *Clin Chem*. 2008 Feb;54(2):371–8.
55. van Werkhoven MA, Thorburn DR, Gedeon AK, Pitt JJ. Monolysocardiolipin in cultured fibroblasts is a sensitive and specific marker for Barth Syndrome. *J Lipid Res*. 2006 Oct;47(10):2346–51.
56. Vaz FM, Houtkooper RH, Valianpour F, Barth PG, Wanders RJA. Only one splice variant of the human TAZ gene encodes a functional protein with a role in cardiolipin metabolism. *J Biol Chem*. 2003 Oct 31;278(44):43089–94.
57. Amoscato AA, Sparvero LJ, He RR, Watkins S, Bayir H, Kagan VE. Imaging mass spectrometry of diversified cardiolipin molecular species in the brain. *Anal Chem*. 2014 Jul 1;86(13):6587–95.
58. Rouser G, Yamamoto A, Kritchevsky G. Cellular Membranes: Structure and regulation of lipid class composition species differences, changes with age, and variations in some pathological states. *Arch Intern Med*. 1971 Jun 1;127(6):1105–21.
59. Horvath SE, Daum G. Lipids of mitochondria. *Prog Lipid Res*. 2013 Oct;52(4):590–614.
60. Aoun M, Fouret G, Michel F, Bonafos B, Ramos J, Cristol J-P, et al.

Dietary fatty acids modulate liver mitochondrial cardiolipin content and its fatty acid composition in rats with non alcoholic fatty liver disease. *J Bioenerg Biomembr.* 2012 Aug;44(4):439–52.

61. Aoun M, Feillet-Coudray C, Fouret G, Chabi B, Crouzier D, Ferreri C, et al. Rat liver mitochondrial membrane characteristics and mitochondrial functions are more profoundly altered by dietary lipid quantity than by dietary lipid quality: effect of different nutritional lipid patterns. *Br J Nutr.* 2012 Mar;107(5):647–59.

62. Chicco AJ, Sparagna GC, McCune SA, Johnson CA, Murphy RC, Bolden DA, et al. Linoleate-rich high-fat diet decreases mortality in hypertensive heart failure rats compared with lard and low-fat diets. *Hypertension.* 2008 Sep;52(3):549–55.

63. Schlame M, Ren M, Xu Y, Greenberg ML, Haller I. Molecular symmetry in mitochondrial cardiolipins. *Chem Phys Lipids.* 2005 Dec;138(1–2):38–49.

64. Schlame M. Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. *J Lipid Res.* 2008 Aug;49(8):1607–20.

65. Schlame M, Haldar D. Cardiolipin is synthesized on the matrix side of the inner membrane in rat liver mitochondria. *J Biol Chem.* 1993 Jan 5;268(1):74–9.

66. Schlame M, Shanske S, Doty S, König T, Sculco T, DiMauro S, et al. Microanalysis of cardiolipin in small biopsies including skeletal muscle from patients with mitochondrial disease. *J Lipid Res.* 1999 Sep;40(9):1585–92.

67. Schlame M, Rua D, Greenberg ML. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res.* 2000 May;39(3):257–88.

68. Pope S, Land JM, Heales SJR. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration; cardiolipin a critical target? *Biochim Biophys Acta.* 2008 Aug;1777(7–8):794–9.

69. Yamaoka S, Urade R, Kito M. Mitochondrial function in rats is affected by modification of membrane phospholipids with dietary sardine oil. *J Nutr.* 1988 Mar;118(3):290–6.

70. Yabuuchi H, O'Brien JS. Brain cardiolipin: isolation and fatty acid positions. *J Neurochem.* 1968 Dec;15(12):1383–90.

71. Schlame M, Beyer K, Hayer-Hartl M, Klingenberg M. Molecular species of cardiolipin in relation to other mitochondrial phospholipids. Is there an acyl specificity of the interaction between cardiolipin and the ADP/ATP carrier? *Eur J Biochem.* 1991 Jul 15;199(2):459–66.
72. Hatch GM. Cardiolipin: biosynthesis, remodeling and trafficking in the heart and mammalian cells (Review). *Int J Mol Med.* 1998 Jan;1(1):33–41.
73. Gomez B, Robinson NC. Phospholipase digestion of bound cardiolipin reversibly inactivates bovine cytochrome bc1. *Biochemistry.* 1999 Jul 13;38(28):9031–8.
74. Eble KS, Coleman WB, Hantgan RR, Cunningham CC. Tightly associated cardiolipin in the bovine heart mitochondrial ATP synthase as analyzed by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem.* 1990 Nov 15;265(32):19434–40.
75. Bazán S, Mileykovskaya E, Mallampalli VKPS, Heacock P, Sparagna GC, Dowhan W. Cardiolipin-dependent reconstitution of respiratory supercomplexes from purified *Saccharomyces cerevisiae* complexes III and IV. *J Biol Chem.* 2013 Jan 4;288(1):401–11.
76. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Jul;4(7):552–65.
77. Kriska T, Girotti AW. Separation and quantitation of peroxidized phospholipids using high-performance thin-layer chromatography with tetramethyl-p-phenylenediamine detection. *Anal Biochem.* 2004 Apr 1;327(1):97–106.
78. Girotti AW, Kriska T. Role of lipid hydroperoxides in photo-oxidative stress signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2004 Apr;6(2):301–10.
79. Gasnier F, Rey C, Hellio Le Graverand MP, Benahmed M, Louisot P. Hormone-induced changes in cardiolipin from Leydig cells: possible involvement in intramitochondrial cholesterol translocation. *Biochem Mol Biol Int.* 1998 Jun;45(1):93–100.
80. Ostrander DB, Sparagna GC, Amoscato AA, McMillin JB, Dowhan W.

Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem.* 2001 Oct 12;276(41):38061–7.

81. Веремеенко КН, Досенко ВЕ, Нагибин ВС, Кизим АИ, Мойбенко АА. Протеолитические ферменты и апоптоз. *Укр. Біохим. Журнал.* 2003; 75(6):10-24.

82. Kagan VE, Bayir HA, Belikova NA, Kapralov O, Tyurina YY, Tyurin VA, et al. Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. *Free Radic Biol Med.* 2009 Jun 1;46(11):1439–53.

83. Vladimirov YA, Proskurnina EV, Izmailov DY, Novikov AA, Brusnichkin AV, Osipov AN, et al. Cardiolipin activates cytochrome c peroxidase activity since it facilitates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> access to heme. *Biochemistry Mosc.* 2006 Sep;71(9):998–1005.

84. Vladimirov YA, Proskurnina EV, Izmailov DY, Novikov AA, Brusnichkin AV, Osipov AN, et al. Mechanism of activation of cytochrome C peroxidase activity by cardiolipin. *Biochemistry Mosc.* 2006 Sep;71(9):989–97.

85. Zachman DK, Chicco AJ, McCune SA, Murphy RC, Moore RL, Sparagna GC. The role of calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> in cardiolipin remodeling in the spontaneously hypertensive heart failure rat heart. *J Lipid Res.* 2010 Mar;51(3):525–34.

86. Saini-Chohan HK, Dhalla NS. Attenuation of ischemia-reperfusion-induced alterations in intracellular Ca<sup>2+</sup> in cardiomyocytes from hearts treated with N-acetylcysteine and N-mercaptopropionylglycine. *Can J Physiol Pharmacol.* 2009 Dec;87(12):1110-9.

87. Jiang F, Ryan MT, Schlame M, Zhao M, Gu Z, Klingenberg M, et al. Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J Biol Chem.* 2000 Jul 21;275(29):22387–94.

88. Hack MH, Helmy FM. A reappraisal of the dog-heart infarct plasmalogen, its conception as a bis-phosphatidic acid and current recognition as an N-acyl

phosphatidyl ethanolamine. *Comp Biochem Physiol*, B. 1982;73(4):873–9.

89. Colcolough HL. A comparative study of acute myocardial infarction in the rabbit, cat and man. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 1974 Sep 1;49(1A):121–5.

90. Lesnefsky EJ, Slabe TJ, Stoll MS, Minkler PE, Hoppel CL. Myocardial ischemia selectively depletes cardiolipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Jun;280(6):H2770-2778.

91. Croston TL, Shepherd DL, Thapa D, Nichols CE, Lewis SE, Dabkowski ER, et al. Evaluation of the cardiolipin biosynthetic pathway and its interactions in the diabetic heart. *Life Sci*. 2013 Sep 3;93(8):313–22.

92. Tepp K, Puurand M, Timohhina N, Adamson J, Klepinin A, Truu L, Shevchuk I, Chekulayev V, Kaambre T. Changes in the mitochondrial function and in the efficiency of energy transfer pathways during cardiomyocyte aging. *Mol Cell Biochem*. 2017 Aug;432(1-2):141-158.

93. Cedikova M, Kripnerová M, Dvorakova J, Pitule P, Grundmanova M, Babuska V, Mullerova D, Kuncova J. Mitochondria in white, brown, and beige adipocytes. *Stem Cells Int*. 2016. 2016:6067349.

94. Стороженко ГВ. Возрастные особенности содержания кардиолипина и фосфатидной кислоты в различных органах крыс линии Вистар. В: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Науково-дослідний інститут біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Матеріали VIII міжнар. симп. «Биологические механизмы старения»; 2008 травня 21-24; Харків. Харків, 2008. с. 48.

95. Стороженко ГВ. Возрастная динамика содержания кардиолипина и фосфатидной кислоты в печени и сердце крыс самцов линии Вистар. В: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. Матеріали III міжнар. конф. молодих науковців «Біологія від молекули до біосфери»; 2008 листопада 18-21; Харків. Харків, 2008. с. 156-157.

96. McMillin JB, Taffet GE, Taegtmeyer H, Hudson EK, Tate CA. Mitochondrial metabolism and substrate competition in the aging Fischer rat heart.

Cardiovasc Res. 1993 Dec;27(12):2222–8.

97. Sparagna GC, Johnson CA, McCune SA, Moore RL, Murphy RC. Quantitation of cardiolipin molecular species in spontaneously hypertensive heart failure rats using electrospray ionization mass spectrometry. *J Lipid Res.* 2005 Jun;46(6):1196–204.

98. Zhong H, Lu J, Xia L, Zhu M, Yin H. Formation of electrophilic oxidation products from mitochondrial cardiolipin in vitro and in vivo in the context of apoptosis and atherosclerosis. *Redox Biol.* 2014;2:878–83.

99. Tyurina YY, Polimova AM, Maciel E, Tyurin VA, Kapralova VI, Winnica DE, et al. LC/MS analysis of cardiolipins in substantia nigra and plasma of rotenone-treated rats: Implication for mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Free Radic Res.* 2015 May;49(5):681–91.

100. Chu CT, Bayır H, Kagan VE. LC3 binds externalized cardiolipin on injured mitochondria to signal mitophagy in neurons: implications for Parkinson disease. *Autophagy.* 2014 Feb;10(2):376–8.

101. Chan RB, Di Paolo G. Knockout punch: cardiolipin oxidation in trauma. *Nat Neurosci.* 2012 Oct;15(10):1325–7.

102. Ji J, Kline AE, Amoscato A, Samhan-Arias AK, Sparvero LJ, Tyurin VA, et al. Lipidomics identifies cardiolipin oxidation as a mitochondrial target for redox therapy of brain injury. *Nat Neurosci.* 2012 Oct;15(10):1407–13.

103. Paradies G, Ruggiero FM, Petrosillo G, Quagliariello E. Age-dependent decline in the cytochrome c oxidase activity in rat heart mitochondria: role of cardiolipin. *FEBS Lett.* 1997 Apr 7;406(1–2):136–8.

104. Ordóñez-Gutiérrez L, Re F, Bereczki E, Ioja E, Gregori M, Andersen AJ, et al. Repeated intraperitoneal injections of liposomes containing phosphatidic acid and cardiolipin reduce amyloid- $\beta$  levels in APP/PS1 transgenic mice. *Nanomedicine.* 2015 Feb;11(2):421–30.

105. Kuo Y-C, Liu Y-C. Cardiolipin-incorporated liposomes with surface CRM197 for enhancing neuronal survival against neurotoxicity. *Int J Pharm.* 2014 Oct 1;473(1–2):334–44.



106. Ardail D, Popa I, Alcantara K, Pons A, Zanetta JP, Louisot P, et al. Occurrence of ceramides and neutral glycolipids with unusual long-chain base composition in purified rat liver mitochondria. *FEBS Lett.* 2001 Jan 19;488(3):160–4.
107. Tserng K-Y, Griffin R. Quantitation and molecular species determination of diacylglycerols, phosphatidylcholines, ceramides, and sphingomyelins with gas chromatography. *Anal Biochem.* 2003 Dec 1;323(1):84–93.
108. Morell P, Radin NS. Specificity in ceramide biosynthesis from long chain bases and various fatty acyl coenzyme A's by brain microsomes. *J Biol Chem.* 1970 Jan 25;245(2):342–50.
109. Ullman MD, Radin NS. Enzymatic formation of 153ioenerg ceramides and comparison with enzymes forming nonhydroxy ceramides. *Arch Biochem Biophys.* 1972 Oct;152(2):767–77.
110. Shimeno H, Soeda S, Yasukouchi M, Okamura N, Nagamatsu A. Fatty acyl-Co A: sphingosine acyltransferase in bovine brain mitochondria: its solubilization and reconstitution onto the membrane lipid liposomes. *Biol Pharm Bull.* 1995 Oct;18(10):1335–9.
111. Bionda C, Portoukalian J, Schmitt D, Rodriguez-Lafrasse C, Ardail D. Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria? *Biochem J.* 2004 Sep 1;382(Pt 2):527–33.
112. Yu J, Novgorodov SA, Chudakova D, Zhu H, Bielawska A, Bielawski J, et al. JNK3 signaling pathway activates ceramide synthase leading to mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem.* 2007 Aug 31;282(35):25940–9.
113. Futerman AH. Intracellular trafficking of sphingolipids: relationship to biosynthesis. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Dec;1758(12):1885–92.
114. Deng X, Yin X, Allan R, Lu DD, Maurer CW, Haimovitz-Friedman A, et al. Ceramide biogenesis is required for radiation-induced apoptosis in the germ line of *C. elegans*. *Science.* 2008 Oct 3;322(5898):110–5.
115. Gudz TI, Tserng KY, Hoppel CL. Direct inhibition of mitochondrial

respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide. *J Biol Chem*. 1997 Sep 26;272(39):24154–8.

116. Malisan F, Testi R. Lipid signaling in CD95-mediated apoptosis. *FEBS Lett*. 1999 Jun 4;452(1–2):100–3.

117. Skulachev VP. Phenoptosis: programmed death of an organism. *Biochemistry Mosc*. 1999 Dec;64(12):1418–26.

118. Mullen TD, Hannun YA, Obeid LM. Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem J*. 2012 Feb 1;441(3):789–802.

119. Pushkareva M, Obeid LM, Hannun YA. Ceramide: an endogenous regulator of apoptosis and growth suppression. *Immunol Today*. 1995 Jun;16(6):294–7.

120. Oskouian B, Saba JD. Cancer treatment strategies targeting sphingolipid metabolism. *Adv Exp Med Biol*. 2010;688:185–205.

121. Dyatlovitskaya EV. The role of lysosphingolipids in the regulation of biological processes. *Biochemistry Mosc*. 2007 May;72(5):479–84.

122. Yang J, Yu Y, Sun S, Duerksen-Hughes PJ. Ceramide and other sphingolipids in cellular responses. *Cell Biochem Biophys*. 2004;40(3):323–50.

123. Bartke N, Hannun YA. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res*. 2009 Apr;50 Suppl:S91-96.

124. van Echten-Deckert G, Herget T. Sphingolipid metabolism in neural cells. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Dec;1758(12):1978–94.

125. Hannun YA, Obeid LM. Many ceramides. *J Biol Chem*. 2011 Aug 12;286(32):27855–62.

126. Samadi A. Ceramide-induced cell death in lens epithelial cells. *Mol Vis*. 2007 Sep 10;13:1618–26.

127. Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA. Programmed cell death induced by ceramide. *Science*. 1993 Mar 19;259(5102):1769–71.

128. Jarvis WD, Fornari FA, Traylor RS, Martin HA, Kramer LB, Erukulla RK, et al. Induction of apoptosis and potentiation of ceramide-mediated cytotoxicity by sphingoid bases in human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem*.

1996 Apr 5;271(14):8275–84.

129. Бабенко НА, Белый АН, Харченко ВС. Роль церамидов с различной длиной ацильной цепи в нарушении функционального состояния клеток печени. Таврический медико-биологический вестник. 2013;16(1):29-33.

130. Стороженко ГВ, Харченко ВС, Бабенко НА. Церамид и фосфолипаза Д-зависимый сигналинг инсулина. В: ДУ «Інститут проблем ендокринної патології імені В.Я. Данилевського НАМН України». Матеріали наук.-практ. конференції «Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології» (Дванадцяті Данилевські читання); 2013 Бер. 14-15; Харків. Харків; 2013. с. 130-1.

131. Allan D. Lipid metabolic changes caused by short-chain ceramides and the connection with apoptosis. Biochem J. 2000 Feb 1;345 Pt 3:603–10.

132. Kartal Yandım M, Apohan E, Baran Y. Therapeutic potential of targeting ceramide/glucosylceramide pathway in cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 2013 Jan;71(1):13–20.

133. Zhang DX, Yi F-X, Zou A-P, Li P-L. Role of ceramide in TNF-alpha-induced impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in coronary arteries. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002 Nov;283(5):H1785-1794.

134. Kong JY, Klassen SS, Rabkin SW. Ceramide activates a mitochondrial p38 mitogen-activated protein kinase: a potential mechanism for loss of mitochondrial transmembrane potential and apoptosis. Mol Cell Biochem. 2005 Oct;278(1–2):39–51.

135. Algeciras-Schimnich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. Mol Cell Biol. 2002 Jan;22(1):207–20.

136. Canbay A, Kip SN, Kahraman A, Gieseler RK, Nayci A, Gerken G. Apoptosis and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. Turk J Gastroenterol. 2005 Mar;16(1):1–6.

137. Young MM, Kester M, Wang H-G. Sphingolipids: regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. J Lipid Res. 2013 Jan;54(1):5–19.

138. Yang G, Badeanlou L, Bielawski J, Roberts AJ, Hannun YA, Samad F. Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Jul;297(1):E211-224.

139. Hannun YA, Obeid LM. The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem*. 2002 Jul 19;277(29):25847–50.

140. Jenkins RW, Canals D, Idkowiak-Baldys J, Simbari F, Roddy P, Perry DM, et al. Regulated secretion of acid sphingomyelinase: implications for selectivity of ceramide formation. *J Biol Chem*. 2010 Nov 12;285(46):35706–18.

141. Jenkins RW, Canals D, Hannun YA. Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cell Signal*. 2009 Jun;21(6):836–46.

142. Babenko NA, Garkavenko VV, Storozhenko GV, Timofiychuk OA. Role of acid sphingomyelinase in the age-dependent dysregulation of sphingolipids turnover in the tissues of rats. *Gen Physiol Biophys*. 2016 Apr;35(2):195–205.

143. Garkavenko VV, Storozhenko GV, Krasnikova ON, Babenko NA. Correction of age-related disorders of sphingolipid content in rat tissues by acid sphingomyelinase inhibition. *IJPP [Internet]*. 2012 [cited 2017 May 20];3(3). Available from: <http://www.dl.begellhouse.com/journals/6ec4ba27650016b1,58a23fd36bf60e8b,4b0d605c3f0ab8cf.html>

144. Sacket SJ, Chung H-Y, Okajima F, Im D-S. Increase in sphingolipid catabolic enzyme activity during aging. *Acta Pharmacol Sin*. 2009 Oct;30(10):1454–61.

145. Kornhuber J, Tripal P, Reichel M, Mühle C, Rhein C, Muehlbacher M, et al. Functional inhibitors of acid sphingomyelinase (FIASMA): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. *Cell Physiol Biochem*. 2010;26(1):9–20.

146. Харченко ВС. Влияние высококалорийной диеты и кверцетина на фосфолипаза Д-зависимый сигналинг инсулина в неокортексе молодых крыс.

Вісник Харківського національного університету імені В Н Каразіна Серія : Біологія. 2012;(15):41–9.

147. Никитин ВН. Экспериментальные подходы к продлению жизни. Проблемы старения и долголетия. 1991;1(1):5–10.

148. Бабенко НО, Стороженко ГВ. Тривале обмеження калорійності харчового раціону попереджає вікові зміни вмісту біологічноактивних сфінго- та гліцероліпідів у тканинах щурів. Фізіол. журн. 2016;62(2):103-109.

149. Буреш Я, Бурешова О, Хьюстон П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. Москва: Высшая школа; 1991. 399 с.

150. Gulbins E, Palmada M, Reichel M, Lüth A, Böhmer C, Amato D, et al. Acid sphingomyelinase-ceramide system mediates effects of antidepressant drugs. Nat Med. 2013 Jul;19(7):934–8.

151. Shinde V, Yegnanarayan R, Shah P, Gupta A, Pophale P. Antidepressant-like activity of flunarizine in modified tail suspension test in rats. N Am J Med Sci. 2015 Mar;7(3):100–3.

152. Castagné V, Moser P, Roux S, Porsolt RD. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. Curr Protoc Neurosci. 2011 Apr;Chapter 8:Unit 8.10A.

153. Cryan JF, Mombereau C, Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. Neurosci Biobehav Rev. 2005;29(4–5):571–625.

154. Mutlu O, Gumuslu E, Ulak G, Celikyurt IK, Korkturk S, Kır HM, et al. Effects of fluoxetine, tianeptine and olanzapine on unpredictable chronic mild stress-induced depression-like behavior in mice. Life Sci. 2012 Dec 17;91(25–26):1252–62.

155. Hanson LR, Fine JM, Svitak AL, Faltesek KA. Intranasal administration of CNS therapeutics to awake mice. J Vis Exp. 2013 Apr 8;(74).

156. Стороженко ГВ. Корекція індукованих етанолом порушень ліпідного профілю у тканинах щурів. Одеський медичний журнал. 2014. 3(143):30-34.

157. Henry B, Möller C, Dimanche-Boitrel M-T, Gulbins E, Becker KA. Targeting the ceramide system in cancer. *Cancer Lett.* 2013 May 28;332(2):286–94.
158. Roth AG, Drescher D, Yang Y, Redmer S, Uhlig S, Arenz C. Potent and selective inhibition of acid sphingomyelinase by bisphosphonates. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48(41):7560–3.
159. Canals D, Perry DM, Jenkins RW, Hannun YA. Drug targeting of sphingolipid metabolism: sphingomyelinases and ceramidases. *Br J Pharmacol.* 2011 Jun;163(4):694–712.
160. Arenz C. Small molecule inhibitors of acid sphingomyelinase. *Cell Physiol Biochem.* 2010;26(1):1–8.
161. Yamashita J, Koi K, Yang D-Y, McCauley LK. Effect of zoledronate on oral wound healing in rats. *Clin Cancer Res.* 2011 Mar 15;17(6):1405–14.
162. Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szelag A, Schulz R. Isolated heart perfusion according to Langendorff – still viable in the new millennium. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2007. 55(2):13–26.
163. Бабенко НА, Стороженко ГВ. Роль церамида в снижении содержания кардиолипина в сердце старых крыс. *Успехи геронтологии.* 2017. 30(1):43-48.
164. Aga-Mizrachi S, Brutman-Barazani T, Jacob AI, Bak A, Elson A, Sampson SR. Cytosolic protein tyrosine phosphatase-epsilon is a negative regulator of insulin signaling in skeletal muscle. *Endocrinology.* 2008 Feb;149(2):605–14.
165. Kamath SA, Narayan KA. Interaction of Ca<sup>2+</sup> with endoplasmic reticulum of rat liver: a standardized procedure for the isolation of rat liver microsomes. *Anal Biochem.* 1972 Jul;48(1):53–61.
166. Lemesko VV. [Microsomal oxidation system in the course of development and aging]. *Biokhimiia.* 1980 Nov;45(11):1964–9.
167. Петренко АЮ, Сукач АН, Росляков АД. Выделение гепатоцитов крыс неферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активности. *Биохимия.* 1991;56(9):1647-1650.

168. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959 Aug;37(8):911–7.
169. Кейтс М. Техника липидологии. Москва: Мир; 1975. 322 с.
170. Финдлей ДжБ, Эванз УГ, редакторы. Биологические мембраны. Методы. Москва: Мир; 1990. 424 с.
171. Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem.* 1959 Mar;234(3):466–8.
172. Kaewsuya P, Danielson ND, Ekhterae D. Fluorescent determination of cardiolipin using 10-N-nonyl acridine orange. *Anal Bioanal Chem.* 2007 Apr;387(8):2775–82.
173. Marsh JB, Weinstein DB. Simple charring method for determination of lipids. *J Lipid Res.* 1966 Jul;7(4):574–6.
174. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265–75.
175. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science.* 1996 Jul 5;273(5271):59–63.
176. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000 Nov 9;408(6809):239–47.
177. Akbar M, Calderon F, Wen Z, Kim H-Y. Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 Aug 2;102(31):10858–63.
178. Miyake H, Nioka S, Zaman A, Smith DS, Chance B. The detection of cytochrome oxidase heme iron and copper absorption in the blood-perfused and blood-free brain in normoxia and hypoxia. *Anal Biochem.* 1991 Jan;192(1):149–55.
179. Parmacek MS, Fox JH, Harrison WH, Garron DC, Swenie D. Effect of aging on brain respiration and carbohydrate metabolism of CBF1 mice. *Gerontology.* 1979;25(4):185–91.
180. Fujishima M, Omae T. Brain blood flow and mean transit time as related to aging. *Gerontology.* 1980;26(2):104–7.

181. Lakatta EG. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation*. 2003 Jan 28;107(3):490–7.
182. Hacker TA, McKiernan SH, Douglas PS, Wanagat J, Aiken JM. Age-related changes in cardiac structure and function in Fischer 344 x Brown Norway hybrid rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Jan;290(1):H304-311.
183. Lancaster TS, Jefferson SJ, Korzick DH. Local delivery of a PKC $\epsilon$ -activating peptide limits ischemia reperfusion injury in the aged female rat heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011 Nov;301(5):R1242-1249.
184. Fannin J, Rice KM, Thulluri S, Dornon L, Arvapalli RK, Wehner P, et al. Age-associated alterations of cardiac structure and function in the female F344xBN rat heart. *Age (Dordr)*. 2014;36(4):9684.
185. Paradies G, Petrosillo G, Gadaleta MN, Ruggiero FM. The effect of aging and acetyl-L-carnitine on the pyruvate transport and oxidation in rat heart mitochondria. *FEBS Lett*. 1999 Jul 9;454(3):207–9.
186. Pepe S, Tsuchiya N, Lakatta EG, Hansford RG. PUFA and aging modulate cardiac mitochondrial membrane lipid composition and Ca<sup>2+</sup> activation of PDH. *Am J Physiol*. 1999 Jan;276(1 Pt 2):H149-158.
187. Hagen TM, Ingersoll RT, Wehr CM, Lykkesfeldt J, Vinarsky V, Bartholomew JC, et al. Acetyl-L-carnitine fed to old rats partially restores mitochondrial function and ambulatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998 Aug 4;95(16):9562–6.
188. Navarro A, López-Cepero JM, Báñez MJ, Sánchez-Pino MJ, Gómez C, Cadenas E, Boveris A. Hippocampal mitochondrial dysfunction in rat aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008 Feb;294(2):R501-9.
189. Navarro A, Boveris A. Brain mitochondrial dysfunction in aging, neurodegeneration, and Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci*. 2010 Sep 1;2. Pii: 34.
190. Navarro A, Boveris A. Brain mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Parkinson's disease. *J Bioenerg Biomembr*. 2009 Dec;41(6):517-21.



191. Petrosillo G, De Benedictis V, Ruggiero FM, Paradies G. Decline in cytochrome c oxidase activity in rat-brain mitochondria with aging. Role of peroxidized cardiolipin and beneficial effect of melatonin. *J Bioenerg Biomembr*. 2013 Oct;45(5):431-40.
192. Paradies G, Ruggiero FM, Quagliariello E. Age-dependent changes in the activity of anion carriers and in the lipid composition in rat heart mitochondria. *Ann N Y Acad Sci*. 1992 Dec 26;673:160-4.
193. Paradies G, Ruggiero FM, Petrosillo G, Gadaleta MN, Quagliariello E. Effect of aging and acetyl-L-carnitine on the activity of cytochrome oxidase and adenine nucleotide translocase in rat heart mitochondria. *FEBS Lett*. 1994 Aug 22;350(2-3):213-5.
194. Paradies G, Ruggiero FM, Petrosillo G, Gadaleta MN, Quagliariello E. Carnitine-acylcarnitine translocase activity in cardiac mitochondria from aged rats: the effect of acetyl-L-carnitine. *Mech Ageing Dev*. 1995 Oct 13;84(2):103-12.
195. Руднева ЮВ, Невзоров ВП, Бабийчук ВГ, Чернявская ЕА, Кулик ВВ. Особенности изменений ультраструктурной организации кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда крыс в динамике старения. *Вісник проблем біології і медицини*; 2014. 2(114):253-258.
196. Kidd JF, Pilkington MF, Schell MJ, Fogarty KE, Skepper JN, Taylor CW, et al. Paclitaxel affects cytosolic calcium signals by opening the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem*. 2002 Feb 22;277(8):6504-10.
197. Rincheval V, Bergeaud M, Mathieu L, Leroy J, Guillaume A, Mignotte B, et al. Differential effects of Bcl-2 and caspases on mitochondrial permeabilization during endogenous or exogenous reactive oxygen species-induced cell death: a comparative study of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, paraquat, t-BHP, etoposide and TNF- $\alpha$ -induced cell death. *Cell Biol Toxicol*. 2012 Aug;28(4):239-53.
198. Bhujade A, Gupta G, Talmale S, Das SK, Patil MB. Induction of apoptosis in A431 skin cancer cells by *Cissus quadrangularis* Linn stem extract by altering Bax-Bcl-2 ratio, release of cytochrome c from mitochondria and PARP cleavage. *Food Funct*. 2013 Feb;4(2):338-46.

199. Wold LE, Aberle NS, Ren J. Doxorubicin induces cardiomyocyte dysfunction via a p38 MAP kinase-dependent oxidative stress mechanism. *Cancer Detect Prev.* 2005;29(3):294–9.
200. Liu Y-Y, Yu JY, Yin D, Patwardhan GA, Gupta V, Hirabayashi Y, et al. A role for ceramide in driving cancer cell resistance to doxorubicin. *FASEB J.* 2008 Jul;22(7):2541–51.
201. Зырняева НН. Исследование эффективности химиотерапии экспериментальной холангиоцеллюлярной карциномы с помощью магнитоуправляемых липосом с доксорубицином [диссертация]. Саранск: Мордовский гос.ун-т им. Н.П.Огарева; 2014. 148 с.
202. Стороженко ГВ, Гарькавенко ВВ. Модуляция вызванных доксорубицином изменений липидного обмена клеток печени ингибиторами сфингомиелиназной активности. В: Укр. біохім. журнал. Матеріали ХІ Українського біохімічного конгресу; 2014 Жовт. 6-10; Київ. Київ; 2014. Т. 86(5, supplement 1). с. 208.
203. Стороженко ГВ. Влияние модуляторов обмена сфинголипидов на содержание кардиолипина в различных тканях крыс. В: Материалах I Международной научно-практической интернет-конференции «Липидология –наука XXI века»; 2013 ноября 26; Казань. 2013. с. 188-189.
204. Argaud L, Prigent A-F, Chalabreysse L, Loufouat J, Lagarde M, Ovize M. Ceramide in the antiapoptotic effect of ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 Jan;286(1):H246-251.
205. Cui J, Engelman RM, Maulik N, Das DK. Role of ceramide in ischemic preconditioning. *J Am Coll Surg.* 2004 May;198(5):770–7.
206. Der P, Cui J, Das DK. Role of lipid rafts in ceramide and nitric oxide signaling in the ischemic and preconditioned hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 2006 Feb;40(2):313–20.
207. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 Jun;52(6):1213–25.

208. Torres VM, Simic VD. Doxorubicin-induced oxidative injury of cardiomyocytes – do we have right strategies for prevention? 2012 [cited 2017 May 31]; Available from: <http://www.intechopen.com/books/cardiotoxicity-of-oncologic-treatments/doxorubicin-induced-oxidative-injury-of-cardiomyocytes-do-we-have-right-strategies-for-prevention->

209. Miyake H, Nioka S, Zaman A, Smith DS, Chance B. The detection of cytochrome oxidase heme iron and copper absorption in the blood-perfused and blood-free brain in normoxia and hypoxia. *Anal Biochem.* 1991 Jan;192(1):149–55.

210. Luberto C, Hassler DF, Signorelli P, Okamoto Y, Sawai H, Boros E, et al. Inhibition of tumor necrosis factor-induced cell death in MCF7 by a novel inhibitor of neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem.* 2002 Oct 25;277(43):41128–39.

211. Doyle E. Saturated fat and beef fat as related to human health. A review of the scientific literature. In 2004. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/3610/9da91fe5570d674017cd9ea59c75ca90bbd2.pdf>

212. Mulligan CM, Sparagna GC, Le CH, De Mooy AB, Routh MA, Holmes MG, et al. Dietary linoleate preserves cardiolipin and attenuates mitochondrial dysfunction in the failing rat heart. *Cardiovasc Res.* 2012 Jun 1;94(3):460–8.

213. Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE. Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *J Biol Chem.* 2001 May 4;276(18):14890–5.

214. Hardy S, El-Assaad W, Przybytkowski E, Joly E, Prentki M, Langelier Y. Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. A role for cardiolipin. *J Biol Chem.* 2003 Aug 22;278(34):31861–70.

215. Sparagna GC, Hickson-Bick DL, Buja LM, McMillin JB. Fatty acid-induced apoptosis in neonatal cardiomyocytes: redox signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2001 Feb;3(1):71–9.

216. Blázquez C, Galve-Roperh I, Guzmán M. De novo-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase. *FASEB J.* 2000 Nov;14(14):2315–22.

217. Paumen MB, Ishida Y, Muramatsu M, Yamamoto M, Honjo T. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1997 Feb 7;272(6):3324–9.

218. Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger RH. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998 Mar 3;95(5):2498–502.

219. Стороженко ГВ. Избыток насыщенных жиров в диете молодых крыс вызывает изменения липидного спектра, характерные для старения. В: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Науково-дослідний інститут біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Матеріали X міжнар. симп. «Биологические механизмы старения»; 2012 травня 16-19; Харків. Харків, 2012. с. 55.

220. Стороженко ГВ, Куликова ВС. Влияние высококалорийной диеты и кверцетина на содержание липидов в печени молодых крыс и ответ ткани на действие инсулина. В: ДУ «Інститут проблем ендокринної патології імені В.Я. Данилевського НАМН України». Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Фундаментальна та клінічна ендокринологія: проблеми, здобутки, перспективи» (Сьомі Данилевські читання); 2008 Лют. 21-22; Харків. Харків; 2008. с. 129-131.

221. Стороженко ГВ. Влияние флавоноида кверцетина на содержание фосфолипидов и кардиолипина в функционально различных тканях крыс. В: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. Матеріали VI наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Валеологія: сучасний стан, напрямки та перспективи розвитку»; 2008 квітня 3-5; Харків. Харків, 2008. Т. 1. с. 215-219.

222. Babenko NA, Semenova YA, Kharchenko VS. Effects of fat-enriched diet on the content of sphingolipids in the brain and on cognitive functions in old rats.

Neurophysiology. 2009 Aug 1;41(4):258–63.

223. Novgorodov S, Riley C, Gudz T. Activation of ceramide-metabolizing pathway in mitochondria from diabetic heart (758.3). FASEB J. 2014 Apr 1;28(1 Supplement):758.3.

224. Novgorodov SA, Riley CL, Yu J, Keffler JA, Clarke CJ, Van Laer AO, et al. Lactosylceramide contributes to mitochondrial dysfunction in diabetes. J Lipid Res. 2016 Apr;57(4):546–62.

225. Chavez JA, Knotts TA, Wang L-P, Li G, Dobrowsky RT, Florant GL, et al. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. J Biol Chem. 2003 Mar 21;278(12):10297–303.

226. Kong JY, Rabkin SW. Palmitate-induced cardiac apoptosis is mediated through CPT-1 but not influenced by glucose and insulin. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002 Feb;282(2):H717-725.

227. Han MS, Park SY, Shinzawa K, Kim S, Chung KW, Lee J-H, et al. Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipoapoptosis of hepatocytes. J Lipid Res. 2008 Jan;49(1):84–97.

228. Стороженко ГВ, Бабенко НА. Влияние пальмитиновой кислоты на содержание кардиолипина и фосфатидной кислоты в изолированных гепатоцитах крыс. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія. 2010. 11(905):32-36.

229. Стороженко ГВ. Изучение влияния пальмитиновой кислоты на содержание кардиолипина в изолированных гепатоцитах старых крыс В: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Науково-дослідний інститут біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Матеріали IX міжнар. симп. «Биологические механизмы старения»; 2010 травня 26-29; Харків. Харків, 2010. с. 25-26.

230. Бабенко НА, Никитин ВН. Возрастные особенности влияния периодического низкокалорийного питания на липидный состав клеток печени, тонкой кишки, жировой ткани и сыворотки крови белых крыс.

Физиол. Журнал. 1990;36(1):60-65.

231. Бабенко НА, Басанец ЛМ, Ежова ОА. Возрастные особенности изменения липидов легких, сердца и мозга белых крыс под влиянием диетических факторов. Физиол. Журнал. 1990;36(6):59-63.

232. Omodei D, Fontana L. Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. FEBS Lett. 2011 Jun 6;585(11):1537–42.

233. Babenko NA, Shakhova EG. Effects of a calorie-restricted diet on the content of phospholipids in the brain and cognitive functions in rats. Neurophysiology. 2012 Jul 1;44(3):201–7.

234. Шахова ОГ, Краснікова ОМ, Бабенко НО. Вплив хронічного обмеження калорійності раціону на вікові особливості орієнтувально-дослідницької поведінки щурів. Фізіологічний журнал. 2012. 58(1):61-67. Fiziologichnyi Zhurnal 58(1)\_\_\_2012\_61-67.pdf [Internet]. [cited 2019 May 13]. Available from:

[http://biph.kiev.ua/fiziol/2012\\_V.58/Fiziologichnyi%20Zhurnal%2058\(1\)\\_2012/Fiziologichnyi%20Zhurnal%2058\(1\)\\_2012\\_61-67.pdf](http://biph.kiev.ua/fiziol/2012_V.58/Fiziologichnyi%20Zhurnal%2058(1)_2012/Fiziologichnyi%20Zhurnal%2058(1)_2012_61-67.pdf)

235. Niemann B, Chen Y, Issa H, Silber R-E, Rohrbach S. Caloric restriction delays cardiac ageing in rats: role of mitochondria. Cardiovasc Res. 2010 Nov 1;88(2):267–76.

236. Pamplona R, Barja G. Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection. Biochim Biophys Acta. 2006 Jun;1757(5–6):496–508.

237. Hernández-Corbacho MJ, Jenkins RW, Clarke CJ, Hannun YA, Obeid LM, Snider AJ, et al. Accumulation of long-chain glycosphingolipids during aging is prevented by caloric restriction. PloS ONE. 2011;6(6):e20411.

238. Xu FY, Kelly SL, Hatch GM. N-Acetylsphingosine stimulates phosphatidylglycerolphosphate synthase activity in H9c2 cardiac cells. Biochem J. 1999 Feb 1;337(Pt 3):483–90.

239. English D, Cui Y, Siddiqui RA. Messenger functions of phosphatidic acid. Chem Phys Lipids. 1996 May 24;80(1–2):117–32.

240. Schatter B, Jin S, Löffelholz K, Klein J. Cross-talk between phosphatidic acid and ceramide during ethanol-induced apoptosis in astrocytes. *BMC Pharmacol.* 2005 Feb 4;5:3.

241. Бардина ЛР, Сатановская ВИ. Метаболическая адаптация к алкоголю у крыс, различающихся по предпочтению этанола воде. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 1999. 456(2):117–122.

242. Hannun YA, Luberto C, Argraves KM. Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry.* 2001 Apr 24;40(16):4893–903.

243. Lesnefsky EJ, Chen Q, Hoppel CL. Mitochondrial Metabolism in Aging Heart. *Circ Res.* 2016 13;118(10):1593–611.

244. Matsuzaki W, Takahashi H, Nakamura H, Murayama T. Effects of glycerophospholipids on ceramide kinase activity: cardiolipin-affected cellular formation of ceramide-1-phosphate. *Biol Pharm Bull.* 2016;39(10):1708–17.

245. Schug ZT, Gottlieb E. Cardiolipin acts as a mitochondrial bioenerge platform to launch apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Oct;1788(10):2022–31.

246. Chirumbolo S. Quercetin in cancer prevention and therapy. *Integr Cancer Ther.* 2013 Mar;12(2):97–102.

247. Rockett BD, Salameh M, Carraway K, Morrison K, Shaikh SR. n-3 PUFA improves fatty acid composition, prevents palmitate-induced apoptosis, and differentially modifies B cell cytokine secretion in vitro and ex vivo. *J Lipid Res.* 2010 Jun;51(6):1284–97.

248. Slee EL, McLennan PL, Owen AJ, Theiss ML. Low dietary fish-oil threshold for myocardial membrane n-3 PUFA enrichment independent of n-6 PUFA intake in rats. *J Lipid Res.* 2010 Jul;51(7):1841–8.

249. Стороженко ГВ. Модулирующее влияние кверцетина на содержание липидов в различных органах крыс при действии этанола. В: *Матеріали Всеукраїнської конференції з міжнародною участю «Актуальні*

проблеми сучасної біохімії та клітинної біології»; 2008 жовтня 30-31; Дніпропетровськ. 2008. с. 112.

250. Стороженко ГВ. Изменение содержания кардиолипина и общих фосфолипидов в печени и сердце крыс при действии этанола и его коррекция рыбьим жиром. В: Матеріали міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології»; 2009 лютого 23-26; Донецьк. 2009. с. 67-68.

251. Kiebish MA, Yang K, Sims HF, Jenkins CM, Liu X, Mancuso DJ, et al. Myocardial regulation of lipidomic flux by cardiolipin synthase: setting the beat for bioenergetics efficiency. *J Biol Chem*. 2012 Jul 20;287(30):25086–97.

252. Choi S-Y, Huang P, Jenkins GM, Chan DC, Schiller J, Frohman MA. A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2006 Nov 8 [cited 2017 May 30];8(11):1255–62. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncb1487>

253. Babenko N, Hassoun L, Budvytiene M, Liesiene J, Geilen C. Natural C18:0-ceramide induces cellular sphingolipid accumulation and apoptosis. *WebmedCentral APOPTOSIS* 2010;1(11):WMC001100

254. Senkal CE, Ponnusamy S, Bielawski J, Hannun YA, Ogretmen B. Antiapoptotic roles of ceramide-synthase-6-generated C16-ceramide via selective regulation of the ATF6/CHOP arm of ER-stress-response pathways. *FASEB J*. 2010 Jan;24(1):296–308.

255. Storozhenko G. Effect of the c2-ceramide on the cardiolipin content in rat hepatocytes. In: Materials of IV International Young Scientists conference «Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution»; 2009 september 16-19; Odessa. 2009. p. 181.

256. Storozhenko G. Cardiolipin content in Wistar rats hepatocytes under exposure to C-2 ceramide. В: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. Матеріали IV міжнародної конференції молодих науковців



«Біологія від молекули до біосфери»; 2009 листопада 17-21; Харків. 2009. с. 64.

257. Стороженко ГВ. Вплив екзогенного C2-цераміда на вміст кардіоліпіна та загальних фосфоліпідів у гепатоцитах тримісячних щурів. В: Фізіол. журнал. Матеріали XVIII з'їзду Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю; 2010 травня 20-22; Одеса. Одеса; 2010. Т. 56(2). с. 199.

258. Бабенко НА, Стороженко ГВ, Гарькавенко ВВ. Роль N-ацетил-d-еритро-сфінгозина в порушенні обміну ліпідів і життєспроможності клітин печінки. Експериментальна і клінічна медицина. 2011;1(50):27-32.

259. Venable ME, Bielawska A, Obeid LM. Ceramide inhibits phospholipase D in a cell-free system. J Biol Chem. 1996 Oct 4;271(40):24800–5.

260. Venable ME, Yin X. Ceramide induces endothelial cell senescence. Cell Biochem Funct. 2009 Dec;27(8):547-51.

261. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Sep 26;92(20):9363–7.

262. Wiegmann K, Schütze S, Machleidt T, Witte D, Krönke M. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. Cell. 1994 Sep 23;78(6):1005–15.

263. Marchesini N, Hannun YA. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. Biochem Cell Biol. 2004 Feb;82(1):27–44.

264. Lee S-Y, Kim JR, Hu Y, Khan R, Kim S-J, Bharadwaj KG, et al. Cardiomyocyte specific deficiency of serine palmitoyltransferase subunit 2 reduces ceramide but leads to cardiac dysfunction. J Biol Chem. 25 May 2012;287(22):18429–39.

265. Siskind LJ, Colombini M. The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis. J Biol Chem. 2000 Dec 8;275(49):38640–4.

266. Elrick MJ, Fluss S, Colombini M. Sphingosine, a product of ceramide

hydrolysis, influences the formation of ceramide channels. *Biophys J*. 2006 Sep 1;91(5):1749–56.

267. Ramos B, Lahti JM, Claro E, Jackowski S. Prevalence of necrosis in C2-ceramide-induced cytotoxicity in NB16 neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol*. 2003 Aug;64(2):502–11.

268. Guo YL, Kang B, Yang LJ, Williamson JR. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and ceramide induce cell death through different mechanisms in rat mesangial cells. *Am J Physiol*. 1999 Mar;276(3 Pt 2):F390–397.

269. Iturralde M, Gamen S, Pardo J, Bosque A, Piñeiro A, Alava MA, et al. Saturated free fatty acid release and intracellular ceramide generation during apoptosis induction are closely related processes. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Oct 20;1634(1–2):40–51.

270. Dinoff A, Herrmann N, Lanctôt KL. Ceramides and depression: A systematic review. *J Affect Disord*. 2017 Apr 15;213:35–43.

271. Brodowicz J, Przegaliński E, Müller CP, Filip M. Ceramide and its related neurochemical networks as targets for some brain disorder therapies. *Neurotox Res*. 2018;33(2):474–84.

272. Jernigan PL, Hoehn RS, Grassmé H, Edwards MJ, Müller CP, Kornhuber J, et al. Sphingolipids in major depression. *Neurosignals*. 2015;23(1):49–58.

273. Brugg B, Michel PP, Agid Y, Ruberg M. Ceramide induces apoptosis in cultured mesencephalic neurons. *J Neurochem*. 1996 Feb;66(2):733–9.

274. France-Lanord V, Brugg B, Michel PP, Agid Y, Ruberg M. Mitochondrial free radical signal in ceramide-dependent apoptosis: a putative mechanism for neuronal death in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 1997 Oct;69(4):1612–21.

275. Hartfield PJ, Mayne GC, Murray AW. Ceramide induces apoptosis in PC12 cells. *FEBS Lett*. 1997 Jan 20;401(2–3):148–52.

276. Toman RE, Movsesyan V, Murthy SK, Milstien S, Spiegel S, Faden AI. Ceramide-induced cell death in primary neuronal cultures: upregulation of

ceramide levels during neuronal apoptosis. *J Neurosci Res*. 2002 May 1;68(3):323–30.

277. Tucker C, Tucker L, Brown K. The Intranasal route as an alternative method of medication administration. *Crit Care Nurse*. 2018 Oct;38(5):26–31.

278. Corrigan M, Wilson SS, Hampton J. Safety and efficacy of intranasally administered medications in the emergency department and prehospital settings. *Am J Health Syst Pharm*. 2015 Sep 15;72(18):1544–54.

279. Patel AA, Patel RJ, Patel SR. Nanomedicine for intranasal delivery to improve brain uptake. *Curr Drug Deliv*. 2018;15(4):461-469

280. Pothion S, Bizot J-C, Trovero F, Belzung C. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behav Brain Res*. 2004 Nov 5;155(1):135–46.

281. Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, Henn FA, Gass P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology*. 2004 Nov;29(11):2007–17.

282. Rygula R, Abumaria N, Flügge G, Fuchs E, Rüther E, Havemann-Reinecke U. Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behav Brain Res*. 2005 Jul 1;162(1):127–34.

283. Shimano MM, Volpon JB. Mechanical behavior of rats' femoral proximal thirds after a period of tail suspension and exercises [Internet]. ResearchGate. 2007. [cited 2017 Jul 7]. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/262555572\\_Mechanical\\_behavior\\_of\\_rats'\\_femoral\\_proximal\\_thirds\\_after\\_a\\_period\\_of\\_tail\\_suspension\\_and\\_exercises](https://www.researchgate.net/publication/262555572_Mechanical_behavior_of_rats'_femoral_proximal_thirds_after_a_period_of_tail_suspension_and_exercises)

284. Krishnan V, Nestler EJ. Animal models of depression: molecular perspectives. *Curr Top Behav Neurosci*. 2011;7:121–47.

285. Can A, Dao DT, Terrillion CE, Piantadosi SC, Bhat S, Gould TD. The Tail Suspension Test. *J Vis Exp* [Internet]. 2012 Jan 28 [cited 2017 Jul 7];(59). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3353516/>

286. Bourin M, Hascoët M. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol*. 2003 Feb 28;463(1–3):55–65.

287. Bansal Y, Kuhad A. Mitochondrial Dysfunction in Depression. *Curr Neuroparmacol*. 2016 Aug;14(6):610–8.

288. Course MM, Wang X. Transporting mitochondria in neurons. *F1000Res* [Internet]. 2016 Jul 18 [cited 2017 Jul 10];5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4955021/>

289. Gong, Y.; Chai, Y.; Ding, J.H.; Sun, X.L.; Hu, G. Chronic mild stress damages mitochondrial ultrastructure and function in mouse brain. *Neurosci. Lett.*, 2011, 488 (1), 76-80.

290. Rezin, G.T.; Cardoso, M.R.; Gonçalves, C.L.; Scaini, G.; Fraga, D.B.; Riegel, R.E.; Comim, C.M.; Quevedo, J.; Streck, E.L. Inhibition of mitochondrial respiratory chain in brain of rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem. Int.*, 2008, 53 (6-8), 395-400

291. Zhao Z, Zhang H-T, Bootzin E, Millan MJ, O'Donnell JM. Association of changes in norepinephrine and serotonin transporter expression with the long-term behavioral effects of antidepressant drugs. *Neuropsychopharmacology*. 2009 May;34(6):1467–81.

292. Mokhtari V, Afsharian P, Shahhoseini M, Kalantar SM, Moini A.A Review on various uses of N-acetylcysteine. *Cell J*. 2017 Apr-Jun;19(1):11-17. Epub 2016 Dec 21

293. Babenko NA, Shakhova EG. Long-term food restriction prevents aging-associated sphingolipid turnover dysregulation in the brain. *Arch Gerontol Geriatr*. 2014 Jun;58(3):420–6.

294. Бабенко Н, Тимофійчук ОА, Хассунех АХМ. Модуляція вісних порушень вмісту сфінголіпідів в тканинах крыс при допомозі інгібування нейтральної сфінгомієлінази. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія*. 2012. 16(1035):152-158.

295. Бабенко НА. Стороженко ГВ. Коррекция вісного порушення вмісту кардіоліпіна в тканинах крыс путем подавлення активності нейтральної сфінгомієлінази. *Проблеми старения и долголетия*.

2015;24(3-4):257-265.

296. Стороженко ГВ. Влияние витамина Е и n-ацетилцистеина на содержание кардиолипина в различных тканях старых крыс. В: Фізіол. журн. (Додаток). Матеріали XIX-го з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнар. участю; 2014; Київ. Київ; 2014. Т. 60(3). с. 187.

297. Rajagopalan V, Canals D, Luberto C, Snider J, Voelkel-Johnson C, Obeid LM, et al. Critical determinants of mitochondria-associated neutral sphingomyelinase (MA-nSMase) for mitochondrial localization. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Apr;1850(4):628–39.

298. Yoshimura S, Banno Y, Nakashima S, Hayashi K, Yamakawa H, Sawada M, et al. Inhibition of neutral sphingomyelinase activation and ceramide formation by glutathione in hypoxic PC12 cell death. *J Neurochem*. 1999 Aug;73(2):675–83.

299. Horres CR, Hannun YA. The roles of neutral sphingomyelinases in neurological pathologies. *Neurochem Res*. 2012 Jun;37(6):1137–49.

300. Airola MV, Hannun YA. Sphingolipid metabolism and neutral sphingomyelinases. *Handb Exp Pharmacol*. 2013;(215):57–76.

301. Kornhuber J, Müller CP, Becker KA, Reichel M, Gulbins E. The ceramide system as a novel antidepressant target. *Trends Pharmacol Sci*. 2014 Jun;35(6):293–304.

302. Babenko NA, Shakhova OG. Effect of an inhibitor of sphingomyelinases, N-acetylcysteine, on cognitive functions in old rats. *Neurophysiology*. 2014 April;46(2):180-182.

303. Dabkowski E, Baseler W, Croston T, Thapa D, Hollander J. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (mPHGPx) overexpression preserves the inner mitochondrial membrane in the diabetic heart. *The FASEB Journal*. 2011 April;25(1\_supplement):1095.5-1095.5.

304. Li J, Romestaing C, Han X, Li Y, Hao X, Wu Y, et al. Cardiolipin remodeling by ALCAT1 links oxidative stress and mitochondrial dysfunction to obesity. *Cell Metab*. 2010 Aug 4;12(2):154–65.

305. Han X, Yang J, Yang K, Zhao Z, Abendschein DR, Gross RW.

Alterations in myocardial cardiolipin content and composition occur at the very earliest stages of diabetes: a shotgun lipidomics study. *Biochemistry*. 2007 May 29;46(21):6417–28.

306. Kontogianni-Konstantopoulos A, Benian G, Granzier H. Advances in Muscle Physiology and Pathophysiology 2011. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2012 [cited 2019 May 25];2012. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3335328/>

307. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*. Oct 2002;51(10):2944–50.

308. Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*. 2005 Jan 21;307(5708):384–7.

309. Jiang F, Ryan MT, Schlame M, Zhao M, Gu Z, Klingenberg M, et al. Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J Biol Chem*. 2000 Jul 21;275(29):22387–94.

310. de Paepe R, Lemaire SD, Danon A. Cardiolipin at the heart of stress response across kingdoms. *Plant Signal Behav*. 2014;9(9):e29228.

311. Ordóñez-Gutiérrez L, Re F, Bereczki E, Ioja E, Gregori M, Andersen AJ, Antón M, Moghimi SM, Pei JJ, Masserini M, Wandosell F. Repeated intraperitoneal injections of liposomes containing phosphatidic acid and cardiolipin reduce amyloid- $\beta$  levels in APP/PS1 transgenic mice. *Nanomedicine*. 2015 Feb;11(2):421–30.

312. Robinson NC, Zborowski J, Talbert LH. Cardiolipin-depleted bovine heart cytochrome c oxidase: binding stoichiometry and affinity for cardiolipin derivatives. *Biochemistry*. 1990 Sep 25;29(38):8962–9.

313. Nguyen HM, Mejia EM, Chang W, Wang Y, Watson E, On N, et al. Reduction in cardiolipin decreases mitochondrial spare respiratory capacity and increases glucose transport into and across human brain cerebral microvascular endothelial cells. *J Neurochem*. 2016;139(1):68–80.

314. Longato L, Tong M, Wands JR, de la Monte SM. High fat diet induced hepatic steatosis and insulin resistance: Role of dysregulated ceramide metabolism. *Hepatol Res.* 2012 Apr;42(4):412-27.

315. Turinsky J, O'Sullivan DM, Bayly BP. 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo. *J Biol Chem.* 1990 Oct 5;265(28):16880–5.

316. Powell DJ, Hajduch E, Kular G, Hundal HS. Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKCzeta-dependent mechanism. *Mol Cell Biol.* 2003 Nov;23(21):7794–808.

317. Schmitz-Peiffer C, Craig DL, Biden TJ. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem.* 1999 Aug 20;274(34):24202–10.

318. Стороженко ГВ. Ефекти екзогенного кардіоліпіну на функціональний стан клітин та тканин старих щурів. В: Матеріали IV міжнародної науково-практичної конференції «Теорія і практика актуальних наукових досліджень»; 2017 жовтня 27-28; Львів. 2017. с. 61-63.

## ДОДАТОК 1

## ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

*Статті у виданнях, які входять до переліку фахових видань України*

1. **Стороженко ГВ**, Бабенко НА. Влияние пальмитиновой кислоты на содержание кардиолипина и фосфатидной кислоты в изолированных гепатоцитах крыс. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія. 2010;11(905):32-36.

2. Гарькавенко ВВ, **Стороженко ГВ**, Краснікова ОМ, Бабенко НО. Корекція вікових порушень вмісту сфінголіпідів у тканинах щурів за допомогою інгібування кислої сфінгомієлінази. Фізіологічний журнал. 2012;58(1):56-60. (Garkavenko VV, **Storozhenko GV**, Krasnikova ON, Babenko NA. Correction of age-related disorders of sphingolipid content in rat tissues by acid sphingomyelinase inhibition. IJPP [Internet]. 2012 [cited 2017 May 20];3(3). Available from:

<http://www.dl.begellhouse.com/journals/6ec4ba27650016b1,58a23fd36bf60e8b,4b0d605c3f0ab8cf.html>) (Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні фізіологічних та біохімічних досліджень, здійснював статистичний аналіз одержаних даних).

*Статті у виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз*

3. Бабенко НО, **Стороженко ГВ**. Тривале обмеження калорійності харчового раціону попереджає вікові зміни вмісту біологічноактивних сфінго- та гліцероліпідів у тканинах щурів. Фізіол. журн. 2016;62(2):103-109. (Babenko NA, Storozhenko GV. Long-term food restriction prevents the age-related changes of the content of biologically active sphingo- and glycerolipids contents in the rat tissues. Fiziolohichnyi Zhurnal [Internet]. 2016 [cited 2017 July 1];62(2):103-9. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29537233> (SCOPUS))



4. Babenko NA, Garkavenko VV, **Storozhenko GV**, Timofiychuk OA. Role of acid sphingomyelinase in the age-dependent dysregulation of sphingolipids turnover in the tissues of rats. Gen. Physiol. Biophys. 2016 Apr;35(2):195–205. (SCOPUS, PubMed) *(Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні фізіологічних та біохімічних досліджень, здійснював статистичний аналіз одержаних даних).*

5. Бабенко НА, Стороженко ГВ. Роль церамида в снижении содержания кардиолипина в сердце старых крыс. Успехи геронтологии. 2017;30(1):43-48. (Babenko NA, **Storozhenko GV**. Role of ceramide in reduction of the cardiolipin content in the heart during aging. Adv Gerontol [Internet]. 2017 July [cited 2017 Sept 16];7(3):195-200.) (SCOPUS, PubMed) Available from: <https://link.springer.com/article/10.1134/S207905701703002X>

*Тези науково-практичних конференцій різного рівня*

6. **Стороженко ГВ**. Влияние флавоноида кверцетина на содержание фосфолипидов и кардиолипина в функционально различных тканях крыс. В: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. Матеріали VI наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Валеологія: сучасний стан, напрямки та перспективи розвитку»; 2008 квітня 3-5; Харків. Харків, 2008. Т. 1. с. 215-219.

7. **Стороженко ГВ**, Куликова ВС. Влияние высококалорийной диеты и кверцетина на содержание липидов в печени молодых крыс и ответ ткани на действие инсулина. В: ДУ «Інститут проблем ендокринної патології імені В.Я. Данилевського НАМН України». Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Фундаментальна та клінічна ендокринологія: проблеми, здобутки, перспективи» (Сьомі Данилевські читання); 2008 Лют. 21-22; Харків. Харків; 2008. с. 129-131. *(Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні фізіологічних досліджень та здійснював статистичний аналіз отриманих даних).*

8. **Стороженко ГВ.** Возрастные особенности содержания кардиолипина и фосфатидной кислоты в различных органах крыс линии Вистар. В: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Науково-дослідний інститут біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Матеріали VIII міжнар. симп. «Биологические механизмы старения»; 2008 травня 21-24; Харків. Харків, 2008. с. 48.

9. **Стороженко ГВ.** Возрастная динамика содержания кардиолипина и фосфатидной кислоты в печени и сердце крыс самцов линии Вистар. В: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. Матеріали III міжнар. конф. молодих науковців «Біологія від молекули до біосфери»; 2008 листопада 18-21; Харків. Харків, 2008. с. 156-157.

10. **Стороженко ГВ.** Модулирующее влияние кверцетина на содержание липидов в различных органах крыс при действии этанола. В: Матеріали Всеукраїнської конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології»; 2008 жовтня 30-31; Дніпропетровськ. 2008. с. 112.

11. **Стороженко ГВ.** Изменение содержания кардиолипина и общих фосфолипидов в печени и сердце крыс при действии этанола и его коррекция рыбьим жиром. В: Матеріали міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології»; 2009 лютого 23-26; Донецьк. 2009. с. 67-68.

12. **Storozhenko G.** Effect of the c2-ceramide on the cardiolipin content in rat hepatocytes. In: Materials of IV International Young Scientists conference «Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution»; 2009 september 16-19; Odessa. 2009. p. 181.

13. **Storozhenko G.** Cardiolipin content in Wistar rat's hepatocytes under exposure to C-2 ceramide. В: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. Матеріали IV міжнародної конференції молодих науковців

«Біологія від молекули до біосфери»; 2009 листопада 17-21; Харків. 2009. с. 64.

14. **Стороженко ГВ.** Вплив екзогенного С2-цераміда на вміст кардіоліпіна та загальних фосфоліпідів у гепатоцитах тримісячних щурів. В: Фізіол. журнал. Матеріали XVIII з'їзду Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю; 2010 травня 20-22; Одеса. Одеса; 2010. Т. 56(2). с. 199.

15. **Стороженко ГВ.** Изучение влияния пальмитиновой кислоты на содержание кардиолипина в изолированных гепатоцитах старых крыс. В: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Науково-дослідний інститут біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Матеріали IX міжнар. симп. «Биологические механизмы старения»; 2010 травня 26-29; Харків. Харків, 2010. с. 25-26.

16. **Стороженко ГВ.** Избыток насыщенных жиров в диете молодых крыс вызывает изменения липидного спектра, характерные для старения. В: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Науково-дослідний інститут біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Матеріали X міжнар. симп. «Биологические механизмы старения»; 2012 травня 16-19; Харків. Харків, 2012. с. 55.

17. **Стороженко ГВ, Харченко ВС, Бабенко НА.** Церамид и фосфолипаза Д-зависимый сигналинг инсулина. В: ДУ «Інститут проблем ендокринної патології імені В.Я. Данилевського НАМН України». Матеріали наук.-практ. конференції «Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології» (Дванадцяті Данилевські читання); 2013 Бер. 14-15; Харків. Харків; 2013. с. 130-1. *(Здобувач брав участь у плануванні експерименту проводив фізіологічні дослідження та аналізував отримані результати).*

18. **Стороженко ГВ.** Влияние модуляторов обмена сфинголипидов на содержание кардиолипина в различных тканях крыс. В: Материалах

I Международной научно-практической интернет-конференции «Липидология – наука XXI века»; 2013 ноября 26; Казань. 2013. с. 188-189.

19. **Стороженко ГВ.** Влияние витамина Е и n-ацетилцистеина на содержание кардиолипина в различных тканях старых крыс. В: Фізіол. журн. (Додаток). Матеріали ХІХ-го з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнар. участю; 2014; Київ. Київ; 2014. Т. 60(3). с. 187.

20. **Стороженко ГВ, Гарькавенко ВВ.** Модуляция вызванных доксорубицином изменений липидного обмена клеток печени ингибиторами сфингомиелиназной активности В: Укр. біохім. журнал. Матеріали ХІ Українського біохімічного конгресу; 2014 Жовт. 6-10; Київ. Київ; 2014. Т. 86(5, supplement 1). с. 208. *(Здобувач брав участь у проведенні експерименту та обговоренні результатів досліджень, оформлював одержані дані у вигляді тез доповіді)*

21. **Стороженко ГВ.** Эффекты экзогенного кардиоліпіну на функціональний стан клітин та тканин старых щурів. В: Матеріали ІV міжнародної науково-практичної конференції «Теорія і практика актуальних наукових досліджень»; 2017 жовтня 27-28; Львів. 2017. с. 61-63.

*Статті, що додатково відображають зміст дисертації*

22. **Бабенко НА, Стороженко ГВ, Гарькавенко ВВ.** Роль N-ацетил-d-эритро-сфингозина в нарушении обмена липидов и жизнеспособности клеток печени. Экспериментальная і клінічна медицина. 2011;1(50):27-32. *(Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні фізіологічних та біохімічних досліджень, здійснював статистичний аналіз одержаних даних).*

23. **Стороженко Г.В.** Корекція індукованих етанолом порушень ліпідного профілю у тканинах щурів. Одеський медичний журнал. 2014;3(143):30-34.

24. **Бабенко НА. Стороженко ГВ.** Коррекция возрастного нарушения содержания кардиолипина в тканях крыс путем подавления активности

нейтральной сфингомиелиназы. Проблемы старения и долголетия. 2015;24(3-4):257-265.

## ДОДАТОК 2

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з навчальної та інноваційної  
роботи Харківського національного  
університету імені В. Н. Каразіна



М. О. Азаренков

## АКТ

про впровадження результатів кандидатської дисертаційної роботи Стороженко Галини Валеріївни «Роль сфінголіпідів у порушенні обміну кардіоліпіну та функціонального стану клітин і тканин у процесі старіння» у навчальні курси на біологічному факультеті Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Комісія у складі завідувача кафедри молекулярної біології та біотехнології, професора, доктора біологічних наук Бондаренка В. А., заступника декана з навчальної роботи, кандидата біологічних наук, доцента Волкової Н. Є. та голови методичної комісії біологічного факультету, кандидата біологічних наук, доцента Мартиненко В. В. встановила, що результати кандидатської дисертації Стороженко Галини Валеріївни, а саме: взаємозв'язок метаболізму сфінголіпідів, кардіоліпіну та фізіологічного стану тканин та клітин впроваджені у навчальний процес на біологічному факультеті при розробці практичних робіт зі 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.

Завідувач кафедри  
фізіології людини та тварин,  
д.б.н., професор

В. А. Бондаренко

Заступник декана з навчальної  
роботи, к.б.н., доцент

Н. Є. Волкова

Голова методичної комісії  
біологічного факультету,  
к.б.н., доцент

В. В. Мартиненко