

ВПЛИВ ІНГІБІТОРА СФІНГОМІЄЛІНАЗ N-АЦЕТИЛЦИСТЕЇНУ НА КОГНІТИВНІ ФУНКЦІЇ У СТАРИХ ЩУРІВ

У роботі вивчали умовнорефлекторну діяльність 24-місячних щурів (рефлекс активного уникання в човниковій камері) на тлі дії N-ацетилцистеїну (N-АЦЦ), що вводився перорально протягом 18 діб. N-АЦЦ покращував когнітивні функції у старих тварин; поліпшувалась оцінка тваринами експериментального завдання, скорочувався латентний період реакції на дію безумовного подразника. Це в цілому сприяло прискоренню вироблення рефлексу порівняно з таким у контрольних щурів. Беручи до уваги те, що N-АЦЦ пригнічує активність нейтральної сфінгомієлінази (СФМази) та нормалізує вміст керамідів у гіпокампі та неокортексі 24-місячних тварин, можна припустити наступне. Важливим фактором, що забезпечує поліпшення когнітивних функцій у старих тварин під дією N-АЦЦ, є зниження гіперпродукції керамідів у мозку щурів; цей ефект реалізується в результаті зниження активності нейтральної СФМази.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: старіння, мозок, N-ацетилцистеїн, сфінгомієліназа (СФМаза), когнітивні функції.

ВСТУП

Відомо, що сфінголіпіди (СФЛ) відіграють важливу роль у реалізації таких ключових фізіологічних процесів у клітинах, як проліферація, апоптоз, секреція та міграція. Відносно стабільний вміст СФЛ у клітинах забезпечується балансом між їх синтезом та деградацією. Однак і при різних стресорних впливах на клітину, і в процесі старіння деградує основний СФЛ мембран сфінгомієлін (СФМ); рівень його метаболіту – кераміду – істотно збільшується. Це відбувається здебільшого за рахунок активації сфінгомієліназ (СФМаз). Порушення балансу біологічно активних СФЛ є досить істотним патогенетичним фактором у розвитку таких захворювань, як депресія, карціногенез, хвороби Альцгеймера та Німана–Піка. Підвищення активності нейтральної СФМази та накопичення керамідів у гіпокампі та неокортексі, які відбуваються у щурів у межах пізнього постнатального онтогенезу [1] або при розвитку нейродегенеративних захворювань, супроводжуються оксидативним ушкодженням мозку та порушенням когнітивних функцій. Так, прогресивне зниження когнітивних функцій

при хворобі Альцгеймера є наслідком порушення глутаматергічної нейротрансмісії внаслідок оксидативного стресу, асоційованого з накопиченням керамідів і амілоїдного β -пептиду в мозку [2].

Одним із інгібіторів нейтральної СФМази є N-ацетилцистеїн (N-АЦЦ) – попередник утворення глутатіону [3]; останній є безпосереднім негативним регулятором активності згаданого ферменту. Уведення N-АЦЦ старим щурам знижує активність нейтральної СФМази та вміст кераміду в гіпокампі і неокортексі, тобто в структурах мозку, що безпосередньо залучені до формування пам'яті [1]. Як продемонстровано на мишах лінії Swiss Webster, введення N-АЦЦ на тлі дії метамфетаміну в нейротоксичних дозах (що призводить до виснаження дофамінергічних маркерів у стріатумі і фронтальній корі мозку) забезпечує відновлення рівня глутатіону в мозку, і це сприяє поліпшенню виконання тваринами когнітивних тестів [4].

Враховуючи важливу роль активації СФМаз та зміни балансу СФЛ у патогенезі психічних і вікових нейродегенеративних захворювань, які супроводжуються порушенням когнітивних функцій, та дані літератури про спроможність N-АЦЦ інгібувати СФМази, у нашій роботі ми оцінювали когнітивні функції старих (24-місячного віку) щурів на тлі дії інгібітора нейтральної СФМази N-АЦЦ.

¹Науково-дослідний інститут біології при Харківському національному університеті ім. В. Н. Каразіна (Україна).
Ел. пошта: babenko@univer.kharkov.ua (Н. А. Бабенко).

МЕТОДИКА

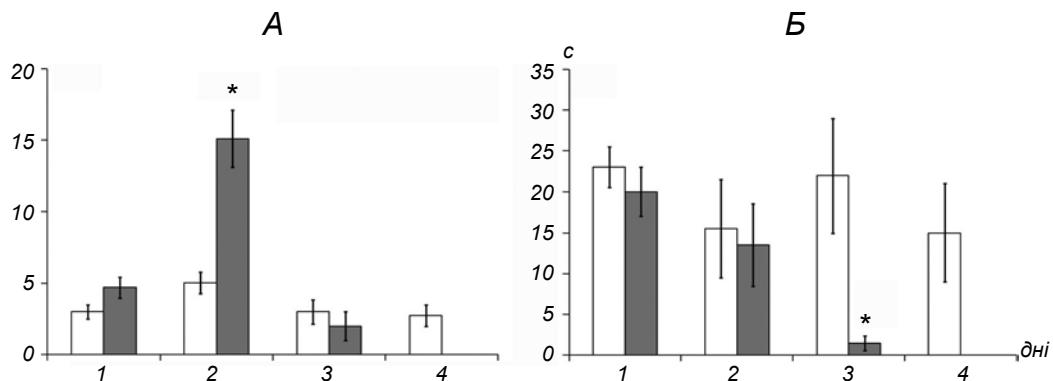
Дослідну групу склали щури-самці лінії Вістар 24-місячного віку, які отримували N-АЦЦ (перорально, 3 ммоль/кг маси тварини протягом 18 діб). Тваринам такого ж самого віку, котрі входили до контрольної групи, вводили розчин глюкози (1 %, перорально, 18 діб). Когнітивні функції щурів оцінювали згідно з виробленням умовного рефлексу активного уникання (УРАУ) больового подразнення. УРАУ виробляли в човниковій камері [5]. Для порівняння даних використовували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA, LSD-тест Фішера), критерій Манна – Уїтні та *t*-критерій Ст'юдента. Міжгрупові розходження вважали статистично вірогідними при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Уведення N-АЦЦ призводило до значного збільшення кількості реалізацій УРАУ щурами при нанесенні больового електроподразнення вже на другий день вироблення цієї реакції (див. рисунок, А) і до значного зниження латентних періодів реакцій позбавлення від даного подразнення на третій день вироблення рефлексу (Б), що вказує на поліпшення оцінки тваринами експериментального завдання. При дії N-АЦЦ середня сумарна кількість активних уникань больового подразнення в перебігу реалізації УРАУ збільшувалася з 11 ± 1.2 до 20 ± 2.1 ($P \leq 0.05$). Кількість поєднань подразників, достатня для досягнення критерію успішності УРАУ, знижувалась із 65 ± 7.3 до 45 ± 3.6 ($P \leq 0.05$). Це свідчить про поліпшення процесу навчання експе-

риментальних тварин під дією N-АЦЦ порівняно з таким у контрольних щурів. Підтвердженням такого висновку слугують результати аналізу даних про частки тварин, у яких виробляли умовний рефлекс. У 100 % щурів, котрим вводили N-АЦЦ, рефлекс було успішно вироблено за три дні експерименту, а в контрольній групі частка тварин, у яких досягли критичного рівня успішної реалізації рефлексу за цей часовий період, була вірогідно меншою (65 %, $P = 0.003$). У 18 % контрольних тварин рефлекс було вироблено на четвертий і п'ятий дні, а у 17 % контрольних щурів рефлекс за вказаний часовий період взагалі виробити не вдалося.

Поліпшення успішності навчання старих тварин під дією N-АЦЦ, продемонстроване в нашій роботі, свідчить про нейропротекторні властивості цього препарату; такі результати узгоджуються з даними літератури. Так, на моделі діабетичної енцефалопатії, індукованої стрептозотоциновим діабетом у самців щурів лінії Вістар, було встановлено, що введення N-АЦЦ поліпшує процес навчання та пам'ять, порушені в результаті оксидативного стресу внаслідок розвитку гіперглікемії [6]. Поліпшення когнітивних функцій відбувалося на тлі зниження інтенсивності оксидативного стресу. В іншому дослідженні зменшення оксидативного стресу під дією N-АЦЦ запобігало викликаному інтоксикацією кадмієм порушенню пам'яті у щурів за рахунок модуляції холінергічної нейротрансмісії [7]. У роботі Йошімура та співавт. було доведено, що N-АЦЦ і глутатіон забезпечують нейропротекторні ефекти в основному не за рахунок своїх антиоксидантних властивостей, а саме в результаті прямого інгібування активності нейтральної СФМази [8].



Вплив N-ацетилцистеїну (N-АЦЦ) на динаміку вироблення умовного рефлексу активного уникання у 24-місячних щурів. А – кількість умовнорефлекторних реакцій активного уникання; Б – латентні періоди реакцій позбавлення від больового подразнення кінцівок. Білими та чорними стовпчиками позначені показники у контрольних тварин і щурів, котрі отримували N-АЦЦ, відповідно. Зірочками відмічені випадки статистично вірогідної відмінності від показників у групі контролю.

Отже, ми встановили, що введення N-АЦЦ старим щурам помітно покращує когнітивні функції тварин. Відбувається швидше засвоєння експериментального завдання, скорочується час реакції на дію безумовного подразника, що в цілому сприяє прискоренню вироблення УРАУ порівняно з таким у контрольних тварин. Важливим фактором, котрий забезпечує поліпшення когнітивних функцій у старих (24-місячних) щурів під дією N-АЦЦ, може бути зниження гіперпродукції керамідів у мозку щурів, що було встановлено в попередньому дослідженні [1]. Це відбувається (в усякому разі значною мірою) в результаті зниження активності нейтральної СФМази.

Роботу виконано за фінансової підтримки гранту Міністерства освіти та науки України «Роль метаболітів сфінгомієлінового циклу в розвитку резистентності клітин до дії фізіологічних стимулів у процесі старіння» (№ ДР 0111U010555).

Експерименти були виконані згідно з положеннями Хельсінкської Декларації 1975 р., переглянутої та доповненої в 2002 р., директивами Національних Комітетів з етики наукових досліджень (Київ, 2001 р.) і настановами Комітету з етики Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна (Україна). У роботі дотримані сучасні правила утримання та використання лабораторних тварин відповідно до принципів Європейської Конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментах та інших наукових цілях (Страсбург, 1985 р.).

У авторів – Н. А. Бабенко та О. Г. Шахової – відсутній конфлікт інтересів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. N. A. Babenko and E. G. Shakhova, "Long-term food restriction prevents aging-associated sphingolipid turnover dysregulation in the brain," *Arch. Gerontol. Geriatr.*, **58**, No. 3, 420 – 426 (2014).
2. D. A. Butterfield and C. B. Pocernich, "The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications," *CNS Drugs.*, **17**, No. 9, 641-652 (2003).
3. C. Adamy, P. Mulder, L. Khouzami, et al., "Neutral sphingomyelinase inhibition participates to the benefits of N-acetylcysteine treatment in post-myocardial infarction failing heart in rats," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **43**, No. 3, 44-53 (2007).
4. C. Achat-Mendes, K. L. Anderson, and Y. Itzhak, "Impairment in consolidation of learned place preference following dopaminergic neurotoxicity in mice is ameliorated by N-acetylcysteine but not D1 and D2 dopamine receptor agonists," *Neuropsychopharmacology*, **32**, No. 3, 531-541 (2007).
5. Я. Буреш, О. Бурешова, П. Хьюстон, *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*, Высш. шк., Москва (1991).
6. S. S. Kamboj, K. Chopra, and R. Sandhir, "Neuroprotective effect of N-acetylcysteine in the development of diabetic encephalopathy in streptozotocin-induced diabetes," *Met. Brain Dis.*, **23**, No. 4, 427-443 (2008).
7. J. F. Gonçalves, A. M. Fiorenza, R. M. Spanevello, et al., "N-acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium," *Chem. Biol. Interact.*, **186**, No. 1, 53-60 (2010).
8. S. Yoshimura, Y. Banno, S. Nakashima, et al., "Inhibition of neutral sphingomyelinase activation and ceramide formation by glutathione in hypoxic PC12 cell death," *J. Neurochem.*, **73**, No. 2, 675-683 (1999).