

ВІКОВІ ЗМІНИ У СФІНГОЛІПІДНОМУ СКЛАДІ ТКАНИН ЦНС ТА ПОВЕДІНКОВИХ РЕАКЦІЯХ ЩУРІВ І ЇХ МОДУЛЯЦІЯ ДІЄТАМИ ЗБАГАЧЕНИМИ ЖИРАМИ РІЗНОЇ НАСИЧЕНОСТІ

© Костіна І.О.¹, Гарькавенко В.В.².

¹ Universität Duisburg-Essen, Anorganische Chemie dept, kostina.ivanna@gmail.com,

² ХНУ імені В.Н. Каразіна, НДІ біології, vladimir.garkavenko@gmail.com,

<https://doi.org/10.34142/2708-5848.2022.24.2.02>

Ми досліджували старіння у самців щурів лінії Вістар 24-місячного віку (у порівнянні з 3-місячними тваринами) та його вплив на сфінголіпідний профіль тканин головного мозку на експериментальних дієтах, збагачених жирами різної жирнокислотної насиченості. До раціону годування старих щурів, збагаченого насиченими жирними кислотами, ми додавали яловичий жир у кількості еквівалентній 38% від добової калорійності. До раціону годування старих щурів, збагаченого ненасиченими жирними кислотами, ми додавали риб'ячий жир у кількості еквівалентній 38% добової калорійності. Щурів ретельно годували та регулярно зважували, а також піддавали сахарозному тесту, щоб виявити перші ознаки депресії, але маркерів депресії виявлено не було. Тому дослідження було зосереджено на тестуванні показників тривоги у тварин похилого віку на експериментальних дієтах та їх порівнянні з тваринами молодого віку. Після 5-тижневого експерименту тварин остаточно дослідили у поведінкових тестах відкритого поля (ВП) і піднесеного хрестоподібного лабіринту (ПХЛ) на тривожність і порівняли зі старими тваринами на стандартному раціоні і молодими 3-місячними щурами. Тривожну поведінку оцінювали у 5-хвилинних тестових відеозаписах за допомогою автоматичного аналізу за у програмі Anymaze. В основному розраховували стандартні показники відвідування центральної та кутової зон для ВП та закритого/відкритого рукава для ПХЛ. Після евтаназії тварин досліджували вміст сфінголіпідів в мозковій тканині, особливо вміст і співвідношення церамідів і сфінгомієліну. Отримані дані демонструють чітку залежність між порушенням метаболізму сфінголіпідів у тканинах мозку при старінні та годуванні надлишковою кількістю насичених жирів з підсиленням тривожності в поведінкових тестах, а також корекцію поведінки та перебудову ліпідного обміну у старих щурів, які годували риб'ячим жиром майже до рівня молодих щурів.

Ключові слова: сфінгомієлін, церамід, ПНЖК, тривожність.

У процесі старіння організму тканини та органи зазнають значних біохімічних та функціональних змін. Змінюється хімічний склад та структура органів і зазвичай погіршується або змінюється їх функціональність. Корекція функції у старечому віці і відновлення її до рівня притаманного молодому організму є основним завданням геріатрії. Відомо, що значної корекції біохімічного складу тканин можна досягти плануванням раціону та введення до нього специфічних аліментарних факторів. У цій роботі ми зосередили увагу на спробі корекції таких як рак, неврологічні та імунні розлади, метаболічний синдром (Nikolova-Karakashian, 2018). Оскільки основа

сфінголіпідного метаболізму у ЦНС старіючого організму щура і дослідженню функціональних змін які відбувалися у наслідок такої корекції та порівнянні з молодими тваринами.

Деякі сфінголіпіди, зокрема цераміди (ЦЕР), є високоактивними сигнальними молекулами що взаємодіють з великою кількістю цитоплазматичних сигнальних каскадів, зокрема вони модулюють активність ПКС-залежних, ПКБ/Akt-залежних та інших каскадів. Метаболізм сфінголіпідів порушується під час старіння і різних асоційованих з ним захворювань, сфінголіпідів – сфінгозин, який включає насичену пальмітинову кислоту, то надлишкове вживання у раціоні жирів

багатих на пальмітинову кислоту може призводити до збільшення загального вмісту сфінголіпідів у клітинах. Ми розглянемо у першу чергу взаємовідношення СФМ/ЦЕР.

Сфінгомієлін (СФМ) – мажоритарний сфінголіпід плазматичної мембрани. Крім цього мембранний СФМ є джерелом біоактивних сфінголіпідних метаболітів, таких як ЦЕР, сфінгозин-1-фосфат, тощо. Особливістю функціонування так званого сфінголіпідного циклу є те що, СФМ водночас займає термінальну позицію у метаболізмі сфінгозину, де одним з проміжних етапів його синтезу є ЦЕР утворений *de novo* церамідсинтазами, і є депонентом для утворення сигнальних ЦЕР сфінгомієліназами (Hannun & Obeid, 2018). ЦЕР є основним біологічно активним сфінголіпідом, що зазвичай стимулює проапоптичний сигналінг. Але, конкретний тип сигналу ЦЕР визначається субклітинним місцем їх утворення і жирнокислотним складом. Тому критичним є розуміння того, який метаболічний шлях відповідає за накопичення ЦЕР (Nikolova-Karakashian, 2018). Також функціонал ЦЕР визначається довжиною жирнокислотного ланцюга. Чим більша довжина ланцюга тим менше сигнальна активність конкретного класу ЦЕР, тому найкоротші цераміди (С16–С18) найчастіше індукують стресовий сигналінг та апоптоз, у той час як довгі (С22–С24) зазвичай мають інші функції. При цьому, у *de novo* синтезі коротколанцюгові ЦЕР утворюються з залишків пальмітинової кислоти, а довголанцюгові зі стеаринової кислоти або інших (Grösch et al., 2012; Hannun & Obeid, 2008). Тому якщо жирнокислотний склад дієти незбалансований і містить надлишок насичених жирних кислот (НЖК) і зокрема пальмітинової кислоти то у мембранах клітин у першу чергу підвищується вміст коротколанцюгових церамідів, індукторів клітинного стресу. Якщо ж у дієті превалюють поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК), баланс утворення ЦЕР схиляється до довголанцюгових форм.

Якщо накопичення ЦЕР прискорюється та не встигає збалансуватися депонуванням у СФМ (це трапляється,

зокрема, при старінні), то надлишок вільних ЦЕР у клітині зумовлює розвиток клітинного стресу та ініціює апоптоз, а на рівні тканини провокує довготривалі прозапальні реакції. Вважається, що це може бути зумовлено віковим підвищенням сфінгомієліназної активності, а отже накопичення ЦЕР проходить за рахунок коротколанцюгових форм С16 та С18 (Grösch et al., 2012). Вочевидь, таке вік-асоційоване збільшення кількості коротколанцюгових ЦЕР створює додаткове навантаження на різні тканини та органи, провокуючи хронічні запальні процеси або масований апоптоз, що у деяких випадках може призводити до дегенерації тканин. Саме цьому ЦЕР вважають не лише маркером старіння але і розглядають як один із чинників, що ініціюють онтогенетичні зміни, поряд з вільними радикалами та деякими іншими індукторами вік-асоційованих патологій.

Власне, у ЦНС при старінні так само як і в більшості інших тканин відбувається накопичення ЦЕР (Khassunekh et al., 2006) і так само ці зміни насамперед асоційовані з підвищенням активності сфінгомієліназ. Низка досліджень вказує на те, що збільшення вмісту ЦЕР з віком у тканинах мозку може призводити до дегенеративних змін (Boitte, 2009), спричиняти тканинну інсулінорезистентність, і викликати такі патології як хвороба Альцгеймеру (Daily et al., 2021).

Як зазначалося вище патологічні або функціональні зміни мозку у наслідок порушення ліпідного обміну можуть відбуватися не лише з віком. Такі зміни напряму корелюють з порушенням ліпідного метаболізму печінки, і, у разі розвитку таких захворювань як цироз або жировий стеатоз, сучасні дослідження переконливо демонструють порушення фізіологічного стану мозку та зміни когнітивних функцій. У широкому сенсі такі порушення функціонального стану ЦНС відбуваються і у наслідок метаболічного синдрому, тощо (Weinstein et al., 2018).

Цікаво відзначити, що якщо порушення нормального функціонування мозку у наслідок метаболічних розладів

ліпідому може відбуватися не лише у старечому віці, а й у результаті незбалансованої дієти, то і корекція деяких патологічних станів, що зазвичай пов'язують з віком, теоретично можлива аліментарними факторами, що нормалізують жировий обмін. Так, наприклад виявилось, що розвиток нейрозапалення при хворобі Альцгеймера можна загальмувати збалансуванням дієти, що зараз розглядається як перспективний метод профілактики (Więckowska-Gacek et al., 2021).

Важливо відзначити, що зміни ліпідного метаболізму внаслідок старіння або розбалансування жирового складу дієти відбуваються як на біохімічному, так і на функціональному стані мозку, а отже і на когнітивних здібностях тварин та поведінкових реакціях. Зокрема, відомо, що вікове розбалансування ліпідного метаболізму може призводити до депресивних або тривожних проявів у поведінці тварин. Це означає, що такі зміни можуть бути ефективно виявлені у поведінковому експерименті. Більш того, для вимірювання поведінкових змін що трапляються у наслідок старіння або під дією експериментальної дієти придатні найбільш базові поведінкові тести відкритого поля (ВП) та піднесеного хрестоподібного лабіринту (ПХЛ) (Shengyuan Yu, 2017). Загальновідомо, що саме ці тести добре виявляють рівень тривожності тварин і інтенсивність дослідницької поведінки завдяки використанню характерної для щурів реакції тигмотаксису, або приливання до стінок лабіринту і намагання сховатися, властивого нормним гризунам. Хоча ВП та ПХЛ тестування є дуже базисним і відпрацьованим інструментом експериментальної фізіології, сучасні можливості автоматизації аналізу даних розкривають і нові можливості методу, він залишається золотим стандартом у галузі (Kozlova, 2022). Саме тому ми обрали ці тести для визначення поведінкових змін в нашому експерименті. Доповнені біохімічним аналізом тканин мозку дані поведінкового аналізу дають можливість у певній мірі репрезентативно описати негативні зміни

та корекції що відбулися з літніми щурами протягом експерименту та порівняти їх з молодими тваринами.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У роботі використовували самців-щурів лінії Вістар 3 та 24-місячного віку, які утримувались у стандартних умовах віварію ХНУ 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). В експеримент було введено чотири групи тварин по 5 щурів-самців різного віку:

- 1) 3-місячні щури, що отримували стандартний раціон,
- 2) 24-місячні щури, що отримували стандартний раціон,
- 3) 24-місячні щури, які отримували 38% калорійності раціону яловичим жиром, багатим насиченими пальмітиною та стеариною ЖК (НЖК),
- 4) 24 місячні щури, які отримували 38% калорійності раціону риб'ячим жиром, багатим на ПНЖК.

Протягом 5 тижнів дослідні щури утримувались на раціоні, енергетична цінність якого складала 146,52 ккал, з яких 9% білків, 38% жирів і 53% вуглеводів. Щури мали вільний доступ до води. Група 24-місячних тварин на стандартному раціоні у ті ж терміни утримувалась на стандартному раціоні віварію, енергетична цінність якого, складала 146,52 ккал, з яких 12 % білків, 14 % жирів і 74 % вуглеводів. Група 3-місячних щурів була приєднана до експерименту за тиждень до завершення (Babenko & Shakhova, 2014). Протягом усіх 5 тижнів 1 раз на тиждень щурів зважували. На 5-й тиждень утримання на висококалорійному раціоні, збагаченому насиченими і ненасиченими ЖК провели сахарозний тест 3 та 24 місячних щурів для виявлення можливих ознак депресії (Zhang et al., 2017). Щурам в індивідуальних клітках надавали вільний доступ до двох

однакових напувалок, що містять водопровідну воду або 2% розчин сахарози. Напувалки жорстко фіксувалися на однаковому рівні і під однаковим кутом нахилу. Праве/ліве положення напувалок з сахарозою та водою регулярно змінювалося. Температура води та розчину сахарози перед заповненням напувалок доводилася до кімнатної температури. Розчин сахарози та води змінювався щодня, напувалки ретельно промивали без використання миючих засобів. Щодня в один і той же час замірявся обсяг випитої рідини в обох напувалках. Добову перевагу сахарози оцінювали і розраховували за формулою:

$$V_{\text{спожитої цукрози}} * 100\% / (V_{\text{спожитої цукрози}} + V_{\text{випитої води}})$$

З дослідними щурами проводили тести відкритого поля (ВП) та піднесеного хрестоподібного лабіринту (ПХЛ). Розміри квадратного ВП були 100 × 100 см, зонування: кутові зони 20 × 20 см, центральна 50 × 50 см, центральний квадрат 20 × 20 см. Щура саджали на центральний квадрат. ПХЛ був у вигляді металевого хреста з двома відкритими і двома закритими рукавами (довжина 45 см, ширина 10 см, висота стінок закритих рукавів 10 см), між рукавами була центральна ділянка 10 × 10 см. Щура саджали на відкритий рукав мордою до входу. Тривалість тестів ВП та ПХЛ становила по 5 хвилин на тест. Тести записували на цифрову відеокамеру Sport Cam HD 1080P. По отриманих записах оцінювали рівень тривожності тварин: у тесті ВП - знаходження у центральних та кутових зонах "поля", у тесті ПХЛ - знаходження на відкритих та закритих рукавах лабіринту (Boguszewski & Zagrodzka, 2002). Записи поведінкових тестів обробляли за допомогою програми AnyMaze7.08.

Для екстракції ліпідів мозку наркотизованих щурів декапітували, мозок швидко витягували, зони неокортексу виділяли на льоду. Екстракцію ліпідів проводили за методом Блая та Даера (Bligh & Dyer, 1959), після чого проводили хроматографічний аналіз ліпідного екстракту.

Поділ ліпідів здійснювали за допомогою тонкошарової хроматографії на пластинках TLC Silica gel 60 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Для поділу сфінголіпідів використовували системи 1 (CH₃CH₂OCH₂CH₃) та 2 (CHCl₃:CH₃OH:H₂O, 40:10:1 за обсягом). Ліпіди на хроматограмах виявляли в парах йоду та ідентифікували, порівнюючи зі стандартами (Babenko et al., 2016). Денситометричний аналіз відносного вмісту сфінголіпідів проводили у програмі ImageJ 1.50b.

Отримані дані були проаналізовані за допомогою Statsoft Statistica. Значущість була встановлена на рівні $\alpha = 0,05$ для всіх порівнянь. Дані були виражені як середнє значення \pm стандартна похибка середнього та проаналізовані за допомогою використання однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA за t-критерієм Ст'юдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Дієта щурів у експерименті була побудована згідно з описаною у літературі верифікованою експериментальною моделлю (Liput et al., 2021). При тривалому годуванні, дієта з підвищеним вмістом насичених жирів має викликати у щурів набір ваги та може призвести до метаболічного синдрому (Nikolova-Karakashian, 2018). Годування щурів раціоном багатим на ПНЖК згідно літературних даних не має викликати підвищення ваги тіла і може мати геропротекторний ефект у піддослідних тварин (Buettner et al., 2006). Дієти, насичені різними типами ЖК спричиняють функціональні зміни внутрішніх органів. Дієти з підвищеним вмістом НЖК можуть інтенсифікувати запальні процеси у тканинах та викликати функціональні порушення органів ЦНС (Deevska et al., 2021). Навпаки, включення до раціону ПНЖК може зменшувати інтенсивність запальних процесів в мозку (Daily et al., 2021). Так само, ПНЖК можуть мати модулюючу дію щодо активності сфінголіпідного циклу і співвідношення ЦЕР/СФМ у старих тварин. У той же час, відома схильність сфінголіпідного циклу старих щурів до розбалансування під впливом надлишка НЖК у дієті. Вміст ЦЕР

та його співвідношення до СФМ цікавий для вивчення показник, з огляду на його велику значущість у розвитку асоційованих з віком патологій.

Перед введенням до експерименту усі 24-місячні тварини були зважені і протягом 5 тижнів ми щотижнево спостерігали зміни ваги тіла, які відображені на Рис 1. У групі

на стандартному раціоні вага тіла практично не змінилася протягом експерименту. Група, що отримувала риба'ячий жир (ПНЖК) демонструвала недостовірні коливання ваги. Група, що отримувала яловичий жир багатий на НЖК, показала значущий та достовірний по відношенню до обох інших груп набір ваги.

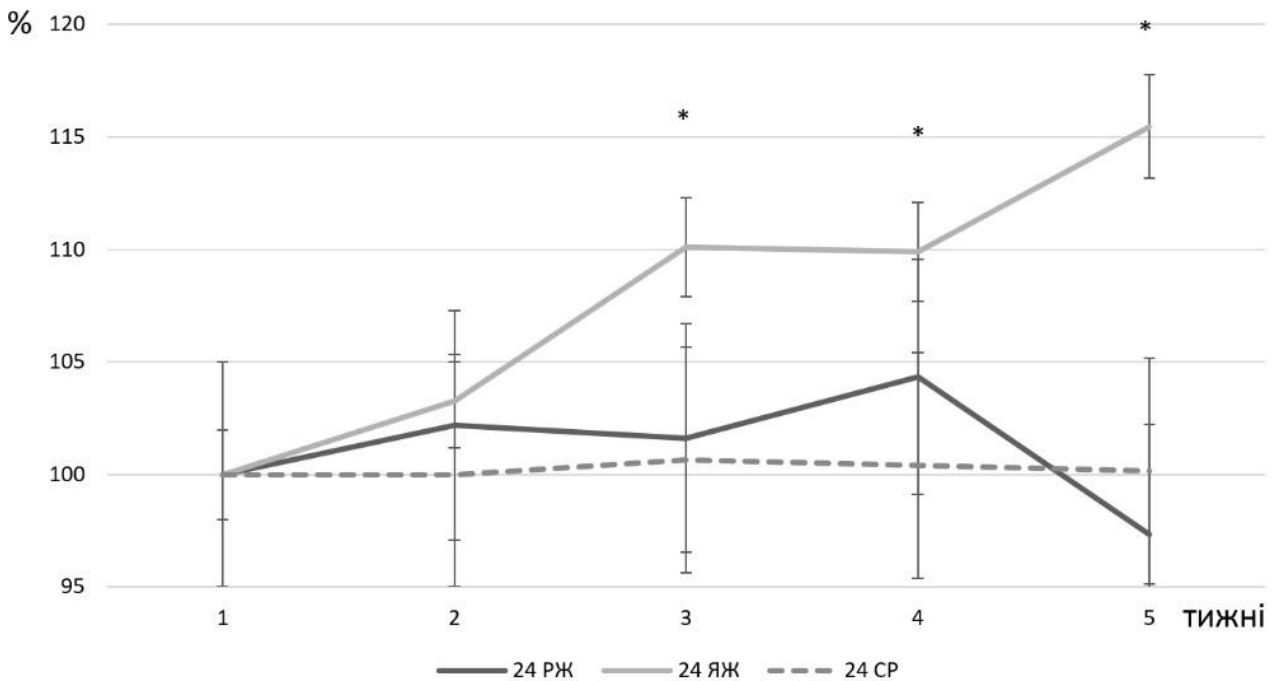


Рис. 1. Зміни середньої по групі ваги щурів (у відсотках до рівня групи старих щурів на стандартному раціоні) протягом 5 тижнів проведення експерименту. 24РЖ- старі щури що отримували риба'ячий жир, 24ЯЖ-старі щури що отримували яловичий жир, 24СР- старі щури що отримували стандартний раціон, 3М- молоді тварини. *- $p < 0,05$ відносно 24СР

Обидві експериментальні групи, що отримували додаткові жири у раціоні мали однакову сумарну калорійність дієти, а отже зміна ваги не залежала від калорійності раціону. Вірогідно, що зміни ваги тіла можуть бути пов'язані з накопиченням ЦЕР відносно до СФМ у наслідок вмісту надлишкових НЖК у дієті (Nikolova-Karakashian, 2018). Тому, щоб оцінити зміни вмісту сфінголіпідів у тканинах по завершенні годування ми здійснили біохімічний аналіз тканин мозку

щурів усіх трьох груп 24 місячних та порівняльної групи 3-місячних тварин. Порушення співвідношення ЦЕР/СФМ вважається одним з можливих індукторів вік-асоційованих патологічних станів (Grösch et al., 2012). На Рис. 2 зображено результати хроматографічного аналізу відносної кількості ЦЕР у мозку щурів, а також різницю у співвідношенні ЦЕР/СФМ залежно від віку тварини та типу отримуваної дієти.

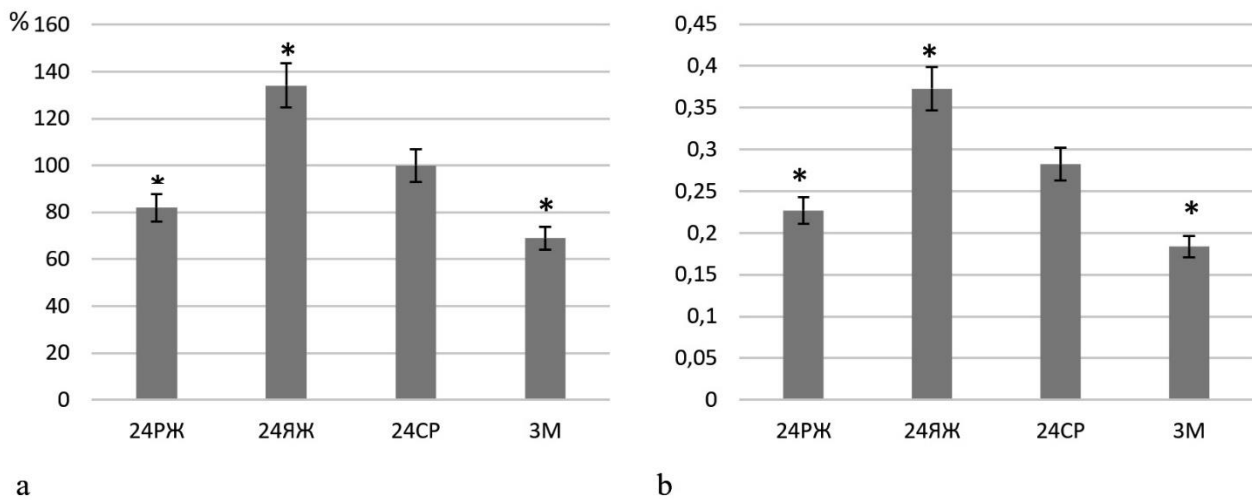


Рис. 2. Результати хроматографічного аналізу відносної (у відсотках до рівня старих щурів на стандартному раціоні) кількості ЦЕР (а) та співвідношення ЦЕР/СФМ (б) у мозку щурів. 24PЖ- старі щури що отримували риб'ячий жир, 24ЯЖ-старі щури що отримували яловичий жир, 24СР- старі щури що отримували стандартний раціон, 3М- молоді тварини. *- $p < 0,05$ відносно 24СР

У групі 24 місячних щурів, яких годували НЖК, кількість ЦЕР мозку збільшена у порівнянні з іншими групами (Рис 2а). Найбільш помітними виявилися зміни вмісту ЦЕР у 24-місячних щурів що отримували яловичий жир, у порівнянні з 3-місячними тваринами, і навіть по відношенню до старих щурів на стандартному раціоні. У той же час, ПНЖК у раціоні знижували вміст ЦЕР у мозку 24 місячних щурів майже до рівня молодих тварин.

Такі саме зміни ми бачимо у співвідношенні ЦЕР/СФМ у обох тканинах (Рис 2b). Це означає, що швидкість метаболізму ЦЕР у СФМ нерівномірна по групах і у старечому віці та під дією підвищеної кількості НЖК у раціоні кількість ЦЕР не встигає компенсуватися його перетворенням у СФМ. З часом зрушення ЦЕР/СФМ балансу, особливо таке значне як на насиченому НЖК раціоні, призводить до деградації тканин і до функціональних порушень у роботі мозку, таких як депресія, підвищена тривожність, тощо (Nakajima et al., 2020). У той же час, корекція ліпідного обміну може спричинити поліпшення функціонального стану старіючого організму.

Згідно до численних літературних даних (Banks, William A., 2010; Barbash et

al., 2017; D I Mostofsky, 1999), зміни ліпідного балансу тканин мозку можуть модулювати когнітивні функції, що у свою чергу може відобразитися на поведінці щурів.

Щоб з'ясувати, чи не розвинулась у тварин під дією експериментальних дієт депресія, ми проводили тест на перевагу сахарози, однак він не дав ані яких достовірних відмінностей між групами, що у купі з відсутністю падіння ваги тіла ми вважаємо ознакою відсутності проявів депресивного стану, тому наші подальші зусилля ми спрямували в першу чергу на виявлення ознак тривожності (Zhang et al., 2017). Зазвичай при нормальному старінні у щурів зростають показники тривожності (Altun et al., 2007) і емоційної активності (Boguszewski & Zagrodzka, 2002). Очікувано, що оскільки експериментальні дієти впливають на обмін ліпідів мозку (Bourge, 2009; Palafox-Sánchez et al., 2021), вони можуть так само модулювати і його функціональний стан що проявлятиметься у змінах поведінки.

Результати аналізу тривожності тварин за факторами що поєднані у групи за методикою (Boguszewski & Zagrodzka, 2002) проілюстровано на рисунку 3.

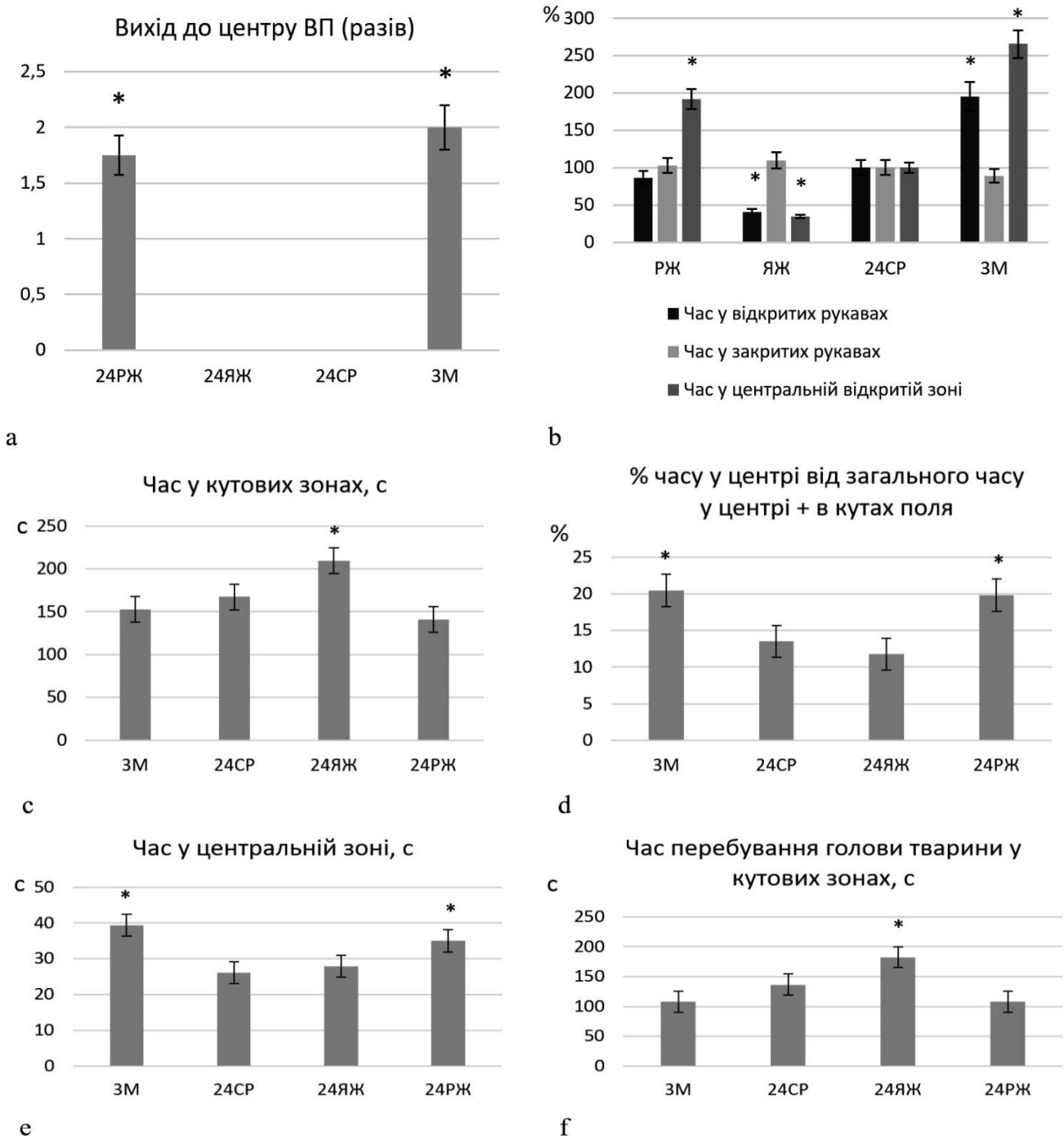


Рис. 3. Рівень середніх по групі показників тривожності на тестах ВП (а, с, d, e, f) та ПХЛ (дані на ПХЛ надані у відсотках до рівня групи старих щурів на стандартному раціоні) (b) залежно від віку тварини та типу отримуваної дієти. 24РЖ- старі щури що отримували рибу'ячий жир, 24ЯЖ-старі щури що отримували яловичий жир, 24СР- старі щури що отримували стандартний раціон, 3М- молоді тварини. *- $p < 0,05$ відносно 24СР

Загалом, 24 місячні щури на стандартній дієті були схильні демонструвати у обох тестах вищі рівні тривожності ніж молоді тварини, що цілком узгоджується з літературними даними (Altun et al., 2007; Peng et al., 1994). Але, за деякими показниками старі тварини що отримували

збагачену жирами дієту демонстрували результати, відмінні від тварин на стандартному раціоні. Так, вихід до центрального квадрату ВП (рис 3а) старі щури на відміну від молодих не демонстрували взагалі, окрім групи, що отримувала рибу'ячий жир, яка виходила

на центральний квадрат лише на 20% рідше за молодих тварин. Загалом, час проведений у центральній зоні ВП (50 × 50см) був найвищий у 3-місячних щурів та найнижчий у групи 24-місячних, що отримувала яловичий жир (рис 3е). Щури, що отримували риб'ячий жир, з усіх старих тварин в середньому проводили більше часу у центральній зоні з показниками близькими до молодих тварин. Вихід до центральної зони, а особливо на центральний квадрат ВП, для щурів є ознакою дослідницької поведінки, а його уникнення – ознакою тривоги (Boguszewski & Zagrodzka, 2002).

Найбільший середній час проведений у кутових зонах ВП демонстрували щури, що отримували дієту збагачену НЖК, а найменший середній час – групи молодих тварин та 24-місячних щурів на раціоні з риб'ячим жиром (рис 3с). Більше того, орієнтація тіла тварини у кутовій зоні також змінювалася залежно від групи: якщо молоді тварини зазвичай знаходяться у кутовій зоні виглядали з неї, сидючи хвостом до кута а головою до центральної зони, старі тварини і особливо ті, що отримували НЖК у раціоні, переважно сиділи головою у кут і хвостом до центральної зони демонструючи таким чином найбільший потяг сховатися і відповідно найбільшу тривожність. У той же час група що отримувала ПНЖК здебільшого орієнтувалася у кутах так само як і молоді тварини (рис 3f).

Відсоткове співвідношення часу, що тварини проводили у центрі від спільного часу проведеного у центральній та кутових зонах (тобто частина часу проведеного у вираженій дослідницькій активності до сумарного часу всіх фіксованих поведінкових актів) також демонструє (рис 3d) майже однаково високі показники для щурів 3-місячної групи та старих тварин які отримували риб'ячий жир, і найнижчий показник для групи старих тварин, що споживали НЖК.

На ПХЛ (рис 3b), де основною ознакою тривожної поведінки вважається уникання відкритих зон лабіринту та тривале завмирання у закритих рукавах, щури демонстрували схоже розподілення

на групи: найменше часу на відкритому рукаві проводили старі щури, що отримували надлишкові НЖК у дієті, а 3-місячні щури проводили найбільше часу на відкритому просторі. Найближчі результати до молодих тварин демонструвала група 24-місячних щурів що отримувала ПНЖК.

Таким чином, за основними показниками тривожності у тестах ВП та ПХЛ група 24-місячних щурів, що отримувала ПНЖК показала високий рівень дослідницької поведінки та достатньо низький рівень тривоги. Результати цієї групи виявилися найближчими до показників 3-місячних тварин. Водночас група, що споживала НЖК, демонструвала майже повну відсутність проявів дослідницької поведінки (вихід до центру поля, вихід на відкриті рукава) і високі показники тривожності. Більше того, ця група у низці показників проявила значно більше ознак тривожної поведінки ніж група старих щурів на стандартному раціоні. За нашої думки, це свідчить про зниження рівня тривожності (і відповідно поживлення дослідницької поведінки) у старих щурів під дією ПНЖК у раціоні, та його підвищення (з пригніченням дослідницьких реакцій) під дією надлишкової кількості НЖК.

ПІДСУМОК

З огляду на дані біохімічного та поведінкового аналізу ми можемо стверджувати потенційно сприятливий вплив введення до раціону продуктів, що є джерелами ПНЖК, на зниження тривожності у старечому віці за рахунок коригування роботи сфінголіпідного циклу у тканинах головного мозку. Навпаки, надлишкове споживання продуктів багатих на НЖК, виходячи з отриманих результатів може призводити до погіршення функціонального стану літнього організму.

ПОДЯКИ

Автори висловлюють свою глибоку вдячність пані Cinzia Boldi за люб'язно надане дослідницьке ПО та консультування від імені компанії Stoelting Europe та пану Данилу Острасю за всебічне технічне сприяння у фільмуванні поведінкового експерименту.

ЛІТЕРАТУРА

- Altun, M., Bergman, E., Edström, E., Johnson, H., & Ulfhake, B. (2007). Behavioral impairments of the aging rat. *Physiology & Behavior*, 92(5), 911–923. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.06.017>
- Babenko, N. A., & Shakhova, E. G. (2014). Long-term food restriction prevents aging-associated sphingolipid turnover dysregulation in the brain. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 58(3), 420–426. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2013.12.005>
- Babenko, N. A., Shevereva, V. M., & Gar'kavenko, V. V. (2016). Changes in the Sphingolipid Content in Tissues and Behavioral Modifications of Rats Subjected to Neurogenic Stress: Role of Sphingomyelinases. *Neurophysiology*, 48(6), 390–398. <https://doi.org/10.1007/s11062-017-9615-0>
- Banks, William A., M., John E. (2010). Basics of Alzheimer's Disease Prevention. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(3), 737–747. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-091576>
- Barbash, S., Garfinkel, B. P., Maoz, R., Simchovitz, A., Nadorp, B., Guffanti, A., Bennett, E. R., Nadeau, C., Türk, A., Paul, L., Reda, T., Li, Y., Buchman, A. S., Greenberg, D. S., Seitz, A., Bennett, D. A., Giavalisco, P., & Soreq, H. (2017). Alzheimer's brains show inter-related changes in RNA and lipid metabolism. *Neurobiology of Disease*, 106, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.06.008>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Boguszewski, P., & Zagrodzka, J. (2002). Emotional changes related to age in rats—A behavioral analysis. *Behavioural Brain Research*, 133(2), 323–332. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(02\)00018-9](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(02)00018-9)
- Bourre, J. M. (2009). Brain lipids and ageing. *B Food for the Ageing Population* (c. 219–251). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781845695484.2.219>
- Buettner, R., Parhofer, K. G., Woenckhaus, M., Wrede, C. E., Kunz-Schughart, L. A., Schölmerich, J., & Bollheimer, L. C. (2006). Defining high-fat-diet rat models: Metabolic and molecular effects of different fat types. *Journal of Molecular Endocrinology*, 36(3), 485–501. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01909>
- D I Mostofsky, S. Y. (1999). Essential fatty acids are mediators of brain biochemistry and cognitive functions. *Neurosci. Res.*, 56, 565–570. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990615\)56:6<565::AID-JNR2>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990615)56:6<565::AID-JNR2>3.0.CO;2-H)
- Daily, J. W., Kang, S., & Park, S. (2021). Protection against Alzheimer's disease by luteolin: Role of brain glucose regulation, anti-inflammatory activity, and the gut microbiota-liver-brain axis. *BioFactors*, 47(2), 218–231. <https://doi.org/10.1002/biof.1703>
- Deevska, G., Dotson, P. P., Mitov, M., Butterfield, D. A., & Nikolova-Karakashian, M. (2021). Onset of Senescence and Steatosis in Hepatocytes as a Consequence of a Shift in the Diacylglycerol/Ceramide Balance at the Plasma Membrane. *Cells*, 10(6), 1278. <https://doi.org/10.3390/cells10061278>
- Grösch, S., Schiffmann, S., & Geisslinger, G. (2012). Chain length-specific properties of ceramides. *Progress in Lipid Research*, 51(1), 50–62. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.11.001>
- Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 139–150. <https://doi.org/10.1038/nrm2329>
- Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2018). Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(3), 175–191. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.107>
- Khassunekh, L. X. M., Semenova, I. O., Krasyl'nykova, O. A., & Babenko, N. O. (2006). [Age-dependent characteristics of signaling lipids in the liver and brain of rats]. *Fiziolohichnyi Zhurnal (Kiev, Ukraine: 1994)*, 52(6), 79–84.
- Kozlova, Yu. V. (2022). Behavior of Rats in the Open Field within the Early Period after Light-Degree Blast-Induced Neurotrauma. *Neurophysiology*, 53(2), 101–108. <https://doi.org/10.1007/s11062-022-09921-z>
- Liput, K. P., Lepczyński, A., Nawrocka, A., Poławska, E., Ogluszka, M., Jończy, A., Grzybek, W., Liput, M., Szostak, A., Urbański, P., Roszczyk, A., Pareek, C. S., & Pierzchała, M. (2021). Effects of Three-Month Administration of High-Saturated Fat Diet and High-Polyunsaturated Fat Diets with Different Linoleic Acid (LA, C18:2n–6) to α -Linolenic Acid (ALA, C18:3n–3) Ratio on the Mouse Liver Proteome. *Nutrients*, 13(5), 1678. <https://doi.org/10.3390/nu13051678>
- Nakajima, S., Fukasawa, K., Gotoh, M., Murakami-Murofushi, K., & Kunugi, H. (2020). Saturated fatty acid is a principal cause of anxiety-like behavior in diet-induced obese rats in relation to serum lysophosphatidyl choline level. *International Journal of Obesity*, 44(3), 727–738. <https://doi.org/10.1038/s41366-019-0468-z>
- Nikolova-Karakashian, M. (2018). Alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: Focus on ceramide. *Advances in Biological Regulation*, 70, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2018.11.004>
- Palafox-Sánchez, V., Ying, Z., Royes, L. F. F., & Gomez-Pinilla, F. (2021). The interaction between brain and liver regulates lipid metabolism in the TBI pathology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1867(4), 166078. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166078>
- Peng, Y. I., Lin, S. H., Chen, T. J., Tai, M. Y., & Tsai, Y. F. (1994). Effects of age on open-field behavior of male rats. *The Chinese Journal of Physiology*, 37(4), 233–236.
- Shengyuan Yu, M. Z. (2017). Depression and anxiety behaviour in a rat model of chronic migraine. *The Journal of Headache and Pain*, 18(27). <https://doi.org/10.1186/s10194-017-0736-z>

Weinstein, G., Zelber-Sagi, S., Preis, S. R., Beiser, A. S., DeCarli, C., Speliotes, E. K., Satizabal, C. L., Vasan, R. S., & Seshadri, S. (2018). Association of Nonalcoholic Fatty Liver Disease With Lower Brain Volume in Healthy Middle-aged Adults in the Framingham Study. *JAMA Neurology*, 75(1), 97–104. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.3229>

Więckowska-Gacek, A., Mietelska-Porowska, A., Chutorański, D., Wydrych, M., Długosz, J., & Wojda, U. (2021). Western Diet Induces Impairment of Liver-

Brain Axis Accelerating Neuroinflammation and Amyloid Pathology in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 136. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.654509>

Zhang, M., Liu, Y., Zhao, M., Tang, W., Wang, X., Dong, Z., & Yu, S. (2017). Depression and anxiety behaviour in a rat model of chronic migraine. *The Journal of Headache and Pain*, 18(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s10194-017-0736-z>

UDC 612.397:159.944.4

AGE CHANGES IN THE SPHINGOLIPID COMPOSITION OF CNS TISSUES AND BEHAVIORAL REACTIONS OF RATS AND THEIR MODULATION BY DIETS ENRICHED WITH FATS OF DIFFERENT SATURATION

Kostina I.O., Harkavenko V.V.

In this work we have investigated aging in male Wistar rats of 24-month-old (comparing to 3-month-old animals) age and its influence on sphingolipid profile of the brain tissues under the experimental diets enriched with fats of different fatty acids saturation. For the saturated fatty acid enriched diet, we added beef fat into old rats feeding in quantity of 38% of the daily ratio energy value. For the unsaturated fatty acid enriched diet, we fed old animals with equivalent 38% daily energy value quantity of fish oil. Rats were accurately fed and weighted regularly and went under sucrose test to indicate the first signs of depression, but no depression markers were found. The research therefore was focused on testing for the anxiety indicators in animals of old age under experimental diets and their comparison to animals of young age. After the 5-week experiment animals were finally tested in behavior tests of open field (OF) and elevated plus maze (EPM) for anxiety and compared with old animals on standard ratio feeding and young 3-month-old rats. Anxiety behavior was evaluated in 5-minute test video records by means of automatic analyzes via Anymaze soft. Mostly the standard indicators of visiting the central and corner zones for OF and closed/open arm for EPM were calculated. After animals were sacrificed the sphingolipid content of brain tissue was investigated, especially ceramides and sphingomyelin content and ratio. Obtained data clearly show the dependence between brain sphingolipid metabolism impairment under the aging and saturated fats surplus feeding with raising of anxiety behavior in tests of old rats on standard diet and saturated fat diet, as well as correction of behavior and reconstitution of lipid metabolism in old rats that were fed with fish oil almost to level of young rats.

Key words: *sphingomyelin, ceramide, PUFA, anxiety, OF, EPM*