

МІТОХОНДРІАЛЬНА ДЕГІДРОГЕНАЗНА АКТИВНІСТЬ НЕРВОВИХ ЗАКІНЧЕНЬ МОЗКУ ЩУРІВ

Т. Тихоненко^{1*}, К. Дякун¹, Ю. Сергійчук²

¹Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України
вул. Леонтовича, 9, Київ 01030, Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 60, Київ 01601, Україна
e-mail: tetiana.tykhonenko@gmail.com

Досліджено вплив вітаміну В₃ (нікотинамід, NAm) та стрептозотоцину (СТЗ) за їх різних концентрацій на мітохондріальну дегідрогеназну активність ізольованих мітохондрій нервових закінчень мозку щурів лінії Wistar. Виявлено, що мітохондріальна дегідрогеназна активність підвищується за дії стрептозотоцину порівняно з показниками контролю, причому його вплив був дозозалежним. Встановлено, що вітамін В₃ проявляв цитопротекторну дію на мітохондрії нервових закінчень, яка була більш виражена до внесення СТЗ, ніж після. Тобто нами було встановлено, що протекторна дія вітаміну В₃ може реалізуватися шляхом його позитивного впливу на мітохондріальну дегідрогеназну активність за цитотоксичної дії стрептозотоцину, що, принаймні, частково буде призводити до нормалізації функціонування нервових закінчень мозку за даних експериментальних умов. Подальші дослідження при використанні більш широкого діапазону концентрацій NAm дозволять з'ясувати, при якій саме концентрації його вплив на мітохондріальну дегідрогеназну активність нервових закінчень мозку щурів буде найбільш ефективним, що сприятиме його застосуванню при дисфункціях мозку різного генезу.

Ключові слова: мітохондріальна дегідрогеназна активність, нікотинамід, стрептозотозин, цукровий діабет.

Відомо, що за багатьох патологій, як генетично детермінованих, так і набутих відбуваються суттєві зміни у перебігу метаболічних процесів, які супроводжуються порушеннями функцій мітохондрій. Значення мітохондрій у живих організмах надзвичайно важливе, оскільки саме ці органели відіграють домінуючу роль у забезпеченні органів, тканин і клітин організму енергією, генерації супероксид-аніон радикалів, реалізації механізмів програмованої загибелі клітини (ПГК) і беруть участь у депонуванні внутрішньоклітинних іонів Ca²⁺ [5, 11, 13]. Дисфункції мітохондрій, у результаті яких продукується надмірна кількість активних форм кисню, призводять до загибелі клітин [14]. Згідно з існуючими даними, принаймні два мітохондріальних протеїни, цитохром с (цит с) та апоптозіндукуючий фактор (AIF), були визначені як ключові сигнальні молекули апоптозу [6]. Ці результати значно вплинули на розуміння участі мітохондрій у контролі клітинної загибелі, що і визначає їх ключову роль у розвитку багатьох патологічних процесів. Набуті порушення функцій мітохондрій при різних патологічних станах виникають переважно як наслідок ушкодження мітохондріальних структур під впливом інтенсифікації вільнорадикальних процесів, активації механізмів їх деградації, стимуляції апоптогенних сигналів, збільшення концентрації іонів кальцію у цитоплазмі клітин органів-мішеней [3]. Дослідження, проведені у Брістолі в 1960-х і 1970-х роках, продемонстрували, що чотири мітохондріальні дегідрогенази активуються іонами кальцію. Це FAD-гліцерин-фосфатдегідрогеназа, піруватдегідрогеназа, NAD-ізоцитратдегідрогеназа і оксоглутаратдегідрогенази. FAD-гліцеринфосфатдегідрогеназа розташована на зовнішній

поверхні внутрішньої мітохондріальної мембрани, і її активність залежить від змін концентрації іонів кальцію у цитоплазмі. Активація цих ензимів має важливе значення у стимуляції дихального ланцюга і, отже, утворенні АТФ за умов підвищеної потреби у цьому нуклеотиді багатьма клітинами ссавців [7–9, 12]. Найбільш поширеними факторами, що призводять до змін активності мітохондріальних дегідрогеназ, є порушення ліпідного обміну, гіперглікемія, утворення агрегатів протеїнів у клітинах, ішемія/реперфузія, токсичні uszkodження. Існують спадкові захворювання, асоційовані з вродженими мутаціями в мітохондріальному геномі. Основним наслідком порушення енергетичного обміну в мітохондріях є пригнічення синтезу АТФ і β -окислення ліпідів. Показано, що існує певний пороговий рівень для зниження внутрішньоклітинного вмісту АТФ, після досягнення якого починається різке пригнічення різних енергозалежних процесів у клітині. Відомо, що порушення переносу електронів між компонентами дихального ланцюга супроводжується генерацією супероксидного аніон-радикала мітохондріями ($O\bullet-2$). $O\bullet-2$, що продукується мітохондріями, активує процеси пероксидного окислення ліпідів, викликає оксидативні модифікації протеїнів і нуклеїнових кислот. Збільшення продукції активних форм кисню (АФК) мітохондріями може не тільки ушкодити, а й мати дисрегуляторний ефект на клітину.

На даний час одним із найбільш поширених ендокринних захворювань є цукровий діабет. Кількість хворих у 2013 році становила 383 млн людей. За прогнозами Міжнародної федерації діабету (IDF), у 2035 році їхня кількість зросте до 591,9 млн. Поширеність цукрового діабету 2 типу вища в деяких етнічних групах населення, а захворюваність зростає у всьому світі, особливо у націях, що не розвиваються. Гіперглікемія як основний патогенетичний механізм розвитку ЦД може призводити до активації утворення АФК у багатьох клітинах. Причини, що призводять до розвитку ЦД 2 типу пов'язані з виникненням інсулінорезистентності, яка розвивається як при порушенні дії інсуліну в тканинах-мішенях, так і при його секреції бета-клітинами підшлункової залози. За цього захворювання функції мітохондрій також змінюються, особливо за його тривалого перебігу та розвитку численних ускладнень. Тобто порушення функціонування мітохондрій на молекулярному рівні як за ЦД 1 типу, так і за ЦД 2 типу може бути одним із патогенетичних механізмів, що залучений до їх розвитку [15].

Для оцінки загальної дегідрогеназної активності мітохондрій дослідження були проведені з використанням мітохондрій нервових закінчень за умов *in vitro*. Нами були вибрані стрептозотин, препарат, який широко використовують для специфічного руйнування бета-клітин підшлункової залози для моделювання ЦД, а також нікотинамід (NAm), який володіє широким спектром дії, зокрема антиоксидантною. Так, NAm, біологічно активна форма вітаміну B_3 , є попередником біосинтезу нікотинамідаденіндинуклеотиду (NAD), який, у свою чергу, залучений до важливих ланок клітинного метаболізму. NAD є коферментом численних дегідрогеназ, які беруть участь в енергетичному обміні клітин. ADP-рибоза, що утворюється з NAD, є субстратом процесів моно- та полі-ADP-рибозилування протеїнів, котрі надактивуються при односторонніх розривах молекул ДНК за апоптичної загибелі нейронів [2]. Наші попередні дослідження продемонстрували, що NAm виявляє нейротропну дію як за фізіологічних умов, так і за розвитку деяких патологічних станів нервової системи, зокрема, діабетичної енцефалопатії [1]. Тому метою нашої роботи було дослідити вплив нікотинаміду на дегідрогеназну активність мітохондрій нервових закінчень головного мозку.

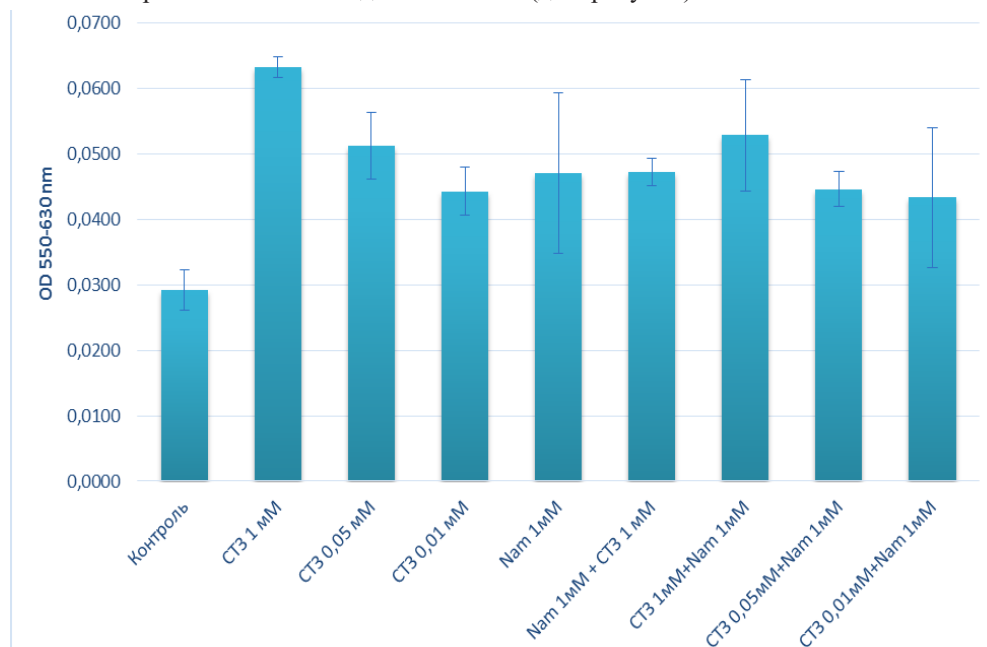
Матеріали та методи

У досліджах було використано реактиви: стрептозотин (СТЗ, “Sigma”, США), нікотинамід (NAm, “Sigma”, США), 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід. Інші реактиви: сахароза, трис(гідроксиметил)-амінометан тощо – кваліфікації не нижче «хч». Дослідження проводили на ізольованих мітохондріях нервових закінчень головного мозку інтактних щурів-самців лінії Вістар. Щурів декапітували, використовуючи

пентабарбіталовий наркоз і швидко вилучали головний мозок. Мозок гомогенізували в 0,32 М сахарозі на 5 мМ Трис-НСІ за допомогою гомогенізатора Поттера. Мітохондрії нервових закінчень головного мозку виділяли методом диференційного центрифугування у градієнті густини сахарози згідно з методом J. P. Abita et al. [1]. Одержані мітохондрії використовували для з'ясування дії досліджуваних сполук (NAm 1 мМ, СТЗ 0,01; 0,05; 1 мМ). Для оцінки мітохондріальної дегідрогеназної активності проводили МТТ-тест [10]. Статистичну обробку одержаних даних здійснювали за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Exscel 2010, до складу якої входить визначення стандартного t-критерію Стьюдента для некорильованих вибірок.

Результати і їхнє обговорення

Як свідчать дані, представлені на рисунку, СТЗ у концентрації 1 мМ призводив до підвищення мітохондріальної дегідрогеназної активності практично у 2,2 разу, у той час як за його концентрації 0,05 мМ - у 1,8 разу і за 0,01 мМ – у 1,5 разу порівняно з контролем. Предінкубація 1мМ СТЗ протягом 15 хв при 37 °С і наступною дією 1мМ NAm протягом 15 хв при 37 °С підвищувала мітохондріальну активність у 1,8 разу порівняно із контролем, тобто NAm пригнічував дію СТЗ за використаної його концентрації, однак сам NAm підвищував активність у 1,6 разу порівняно із контролем. Предінкубація мітохондрій із 1мМ NAm із наступним внесенням 1 мМ СТЗ призводила до збільшення активності у 1,6 разу, а предінкубація із 1 мМ СТЗ, а потім внесення 1мМ NAm - у 1,8 разу. Ці дані дають підстави стверджувати, що NAm у концентрації 1мМ здатен частково нормалізувати дегідрогеназну активність мітохондрій, яка змінювалася за дії СТЗ, тим самим проявляючи протекторну дію. При преінкубуванні СТЗ у концентраціях 0,05мМ та 0,01мМ, та наступному додаванні 1мМ NAm мітохондріальна дегідрогеназна активність була у 1,5 разу більша від контролю. Згідно з цими даними, можна вважати, що дія СТЗ на мітохондріальну дегідрогеназну активність нервових закінчень є дозозалежною (див. рисунок).



Ефект NAm на мітохондріальну дегідрогеназну активність нервових закінчень за дії стрептозотозину у різних концентраціях (M±m, n=5)

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що нікотинамід здатен проявляти нейропротекторну дію, частково нормалізуючи функціонування нервових закінчень мозку щурів шляхом його позитивного впливу на мітохондріальну дегідрогеназну активність на тлі ушкоджуючої дії стрептозоточину на мітохондрії за даних експериментальних умов, що може знайти застосування при різного генезу дисфункціях мозку.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Кучмеровська Т.М., Донченко Г.В., Тихоненко Т.М. та ін. Вплив нікотинаміду на життєздатність острівцевих клітин підшлункової залози // Укр. біохім. журн. 2012. Т. 84. № 2. С. 81-88.
2. Сергійчук Ю.Т., Конопельнюк В.В., Тихоненко Т.М., Кучмеровська Т.М. Корекція окремих ланок обміну серотоніну за експериментального цукрового діабету 2 типу // Ендокринологія. 2014. Т. 19. № 3. С. 210-216.
3. Судаков Н.П., Никифоров С.Б., Невинский Г.А. и др. Роль митохондриальной дисфункции в патогенезе социально-значимых заболеваний // Биология. Экология. 2008. Т. 1, № 2. С. 11-14.
4. Abita I. P., Chicheportiche R., Schweitz M. Effect of neurotoxins (veratridine, sea anemonetoxin, tetrodo-toxin) on transmitter accumulation. Release by nerve terminals in vitro // Biochem. 1977. 16. № 9. P. 1838-1864.
5. Azzone G. F., Massari S. Active transport and binding in mitochondria // Biochim. Biophys. Acta. 1973. № 301. P. 195-226.
6. Cai J., Yang J., Jones D. P. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 1998. Vol. 1366. 1-2. P. 139-149.
7. Denton R. M., Randle P. J., Martin B. R. Stimulation by calcium-ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase // Biochem. J. 1972. № 128(1). P. 161-163.
8. Denton R. M., Richards D. A., Chin J. G. Calcium-ions and the regulation of NAD⁺-linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat-heart and other tissues // Biochem. J. 1978. № 176. P. 899-906.
9. Hansford R. G., Chappell J. B. Effect of Ca²⁺ on oxidation of glycerol phosphosphate by blowfly flight-muscle mitochondria // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1967. № 27. P. 686-694.
10. Kassók P., Przygodzki T., Habodószovó D. et.al. Mitochondrial alterations induced by 532 nm laser irradiation // Gen. Physiol. Biophys. 2005. № 24. P. 209-22.
11. Lee C. P., Ernster L. Equilibrium studies of the energy-dependent and non-energy-dependent pyridine nucleotide transhydrogenase reactions // Biochim. Biophys. Acta. 1964. № 81. P. 187-190.
12. McCormack J. G., Denton R. M. Effects of calcium-ions and adenine-nucleotides on the activity of pig-heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex // Biochem. J. 1979. № 180. P. 533-544.
13. Mitchell P. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism // Nature. 1961. № 191. P. 144-148.
14. Rosser B. G., Gores G. J. Liver cell necrosis: Cellular mechanisms and clinical implications // Gastroenterology. 1995. № 108. P. 252-275.
15. Sivitz W. I., Yorek M. A. Mitochondrial Dysfunction in Diabetes: From Molecular Mechanisms to Functional Significance and Therapeutic Opportunities // Antioxidants & Redox Signaling. 2010. Vol. 12. P. 537-577.

Стаття: надійшла до редакції 26.07.16
доопрацьована 2.09.16
прийнята до друку 5.09.16

MITOCHONDRIAL DEHYDROGENASE ACTIVITY OF RAT BRAIN NERVE ENDINGS

T. Tykhonenko¹, K. Dyakun¹, Yu. Sergiichuk²

¹*Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine
9, Leontovych St., Kyiv 01030, Ukraine*

²*National Taras Shevchenko University
60, Volodymyrska St., Kyiv 01601, Ukraine
e-mail: tetiana.tykhonenko@gmail.com*

It was investigated the effect of vitamin B₃ (nicotinamide, NAm) and streptozotocin (STZ) in their different concentrations on mitochondrial dehydrogenase activity of isolated mitochondria of nerve endings of the brain rats Wistar. Streptozotocin enhanced mitochondrial dehydrogenase activity compared with control, and its effect was dose-dependent. It was found cytoprotective effect of vitamin B₃ on the mitochondria of nerve endings, which was more pronounced before STZ action than after. That is, we have elucidated that the protective effect of vitamin B₃ can be realized through its positive effects on mitochondrial dehydrogenase activity at cytotoxic action of streptozotocin that at least partly will lead to the normalization of the functioning of the nerve endings of the brain under these experimental conditions. Further studies using a broader range of concentrations NAm will allow to find exactly its most effective concentration on mitochondrial dehydrogenase activity of rat brain nerve endings to promote its use in brain dysfunctions of different genesis.

Keywords: mitochondrial dehydrogenase activity, nicotinamide, streptozotocin, diabetes mellitus.

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДЕГИДРОГЕНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЙ МОЗГА КРЫС

Т. Тихоненко¹, К. Дякун¹, Ю. Сергийчук²

¹*Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины
ул. Леонтовича, 9, Киев 01030, Украина*

²*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко
ул. Владимирская, 60, Киев 01030, Украина
e-mail: tetiana.tykhonenko@gmail.com*

Исследовано влияние витамина В₃ (никотинамид, NAm) при разных концентрациях стрептозотоцина (СТЗ) на митохондриальную дегидрогеназную активность изолированных митохондрий нервных окончаний мозга линии Wistar. Обнаружено, что митохондриальная дегидрогеназная активность повышается под воздействием стрептозотоцина по сравнению с показателями контроля, причем его влияние было дозозависимым. Установлено, что витамин В₃ проявлял цитопротекторное действие на митохондрии нервных окончаний, которое было более выражено до внесения СТЗ, чем после. То есть нами было показано, что протекторное действие витамина В₃ может реализоваться путем его положительного влияния на митохондриальную дегидрогеназную активность при цитотоксическом действии стрептозотоцина, что, по крайней мере, частично будет приводить к нормализации функционирования нервных окончаний мозга при данных экспериментальных условиях. Дальнейшие исследования при использовании более широкого диапазона концентраций NAm позволят выяснить, при какой именно концентрации его влияние на митохондриальную дегидрогеназную активность нервных окончаний мозга крыс будет наиболее эффективным, что будет способствовать его применению при дисфункциях мозга различного генезиса.

Ключевые слова: митохондриальная дегидрогеназная активность, никотинамид, стрептозотозин, сахарный диабет.