



УДК 616.379-008.64:577.117

© 2008

Т. М. Кучмеровська, І. О. Шиманський, член-кореспондент НАН
України Г. В. Донченко, Л. В. Яніцька, В. М. Копелевич,
А. П. Клименко

Ефект ацетил-L-карнітину на мітохондріальну функцію та вивільнення серотоніну при цукровому діабеті

A close relation between the impaired energy metabolism and the serotonin release from isolated synaptic terminals is established. These data suggest a substantial role of mitochondria in the derangement of the synaptic function associated with diabetes. Positive neuromodulatory role of acetyl-L-carnitine on the serotonergic system is found. It is most likely to be mediated by its normalizing effect on the energy metabolism.

Відомо, що більшість змін у центральній нервовій системі (ЦНС) при цукровому діабеті (ЦД) є вторинними стосовно цереброваскулярних та метаболічних порушень. Проте специфічні зміни у функціонуванні нейротрансмітерних систем та транспорту через гематоенцефалічний бар'єр можуть бути первинними у розвитку когнітивних дисфункцій, психічних (депресії), нейрологічних та нейроендокринних порушень при діабетичній енцефалопатії [1]. Найбільш вивченими при ЦД є класичні нейротрансмітерні системи групи моноамінів, зокрема наші попередні дослідження свідчать про порушення за даної патології процесів як спонтанного, так і індукованого вивільнення, а також зворотного поглинання серотоніну, дофаміну та γ -аміномасляної кислоти ізольованими синаптичними закінченнями головного мозку щурів.

Дослідженнями виявлено, що мітохондрії можуть відігравати важливу роль у процесах поглинання і вивільнення медіаторів та забезпечували нормальне функціонування нейротрансмітерних систем [2]. Відомо, що у функціонуванні мітохондрій істотну роль відіграє L-карнітин. Він бере участь у транспорті жирних кислот через внутрішню мітохондріальну мембрану до матриксу, де вони окиснюються, продукуючи енергію в різних тканинах [3]. Карнітин бере участь й у β -окисненні довголанцюгових жирних кислот, а також сприяє клітинній деінтоксикації, стимулює біосинтез ацетилхоліну з холіну, оптимізує метаболічні реакції за участю коферменту А та обмін глюкози й білка [4].

Акумуляція довголанцюгових жирних кислот, а також порушення їх β -окиснення внаслідок дефіциту L-карнітину та/або його етирфікованих похідних може негативно впливати на функцію нервових клітин при діабеті, зокрема, порушуючи цілісність цитоплазматичної та мітохондріальної мембран, внутрішньоклітинний метаболізм та енергоутворення [5].

Метою даної роботи було вивчити можливий зв'язок між рівнем L-карнітину, функціональним станом мітохондрій та порушеннями процесів вивільнення серотоніну ізольованими синаптичними закінченнями головного мозку щурів, а також з'ясувати можливий механізм нейропротекторної дії ацетил-L-карнітину (AL-карнітин).

Дослідження проводили на моделі шеститижневого експериментального діабету, який індукували введенням стрептозотоцину в дозі 60 мг/кг маси тіла внутрішньочеревинно. Після чотирьох тижнів розвитку стрептозотоцинового діабету щурам протягом двох тижнів вводили AL-карнітин у дозі 150 мг/кг внутрішньочеревинно. Рівень глюкози в крові визначали за допомогою глюкометра Precision Xtra Plus (MediSense UK Ltd., Охон, UK).

Синаптосоми головного мозку виділяли методом диференційного центрифугування в градієнті густини сахарози методом Абіта [6]. При дослідженні процесу вивільнення серотоніну спочатку синаптосоми (1 мг білка/мл середовища) навантажували [2-¹⁴C]серотоніном (57 мКи/ммоль, кінцева концентрація якого становила 1,48 мкмоль/л) в інкубаційному середовищі такого складу: NaCl 126; KCl 5; MgCl₂ 14,2; CaCl₂ 1,0; глюкоза 10,0; Na-фосфатний буфер, рН 7,4–10,0, до якого додавали інгібітор моноаміноксидази іпроніазид (10⁻⁵ моль/л) для запобігання розщепленню міченого медіатора. Після закінчення інкубації (10 хв при 37 °С) проби швидко фільтрували та фільтри GF/C “Whatman” з навантаженим міченим нейромедіатором поміщали у перфузійні камери, під'єднані до перистальтичного насосу і промивали інкубаційним середовищем (3 мл) зі швидкістю 1,0 мл/хв. Фракції з радіоактивністю, що вивільнилася, збирали кожної хвилини упродовж 3 хв і підраховували радіоактивність у сцинтиляційній рідині РС-103. Вивільнення серотоніну виражали в процентах [7].

Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування [6]. Мембранний потенціал мітохондрій визначали за поглинанням родаміну 123 (Rh123) [8].

Активність Na⁺,K⁺-АТРази досліджували спектрофотометром за методом, який базується на визначенні кінцевого продукту АТРазних реакцій — фосфату, після утворення ним забарвленого комплексу з молібдатом амонію [9]. Вміст L-карнітину визначали у плазмі крові та головному мозку радіоферментним методом [10]; рівень АТФ та сорбітолу — ферментативно у депротейнізованих та деіонізованих кислотних екстрактах, згідно з даними роботи [11]; вміст білка — методом Лоурі. Статистичний аналіз отриманих даних здійснювали, використовуючи стандартний *t*-критерій Стьюдента для некорельованих виборок.

Після шести тижнів розвитку діабету рівень глюкози в крові щурів підвищувався у 4,7 раза у порівнянні з контрольними тваринами.

Як свідчать дані, представлені на рис. 1, діабет призводив до істотного зниження рівня L-карнітину як у плазмі крові, так і в мозку стосовно контролю. Рівень карнітину в плазмі крові досить часто використовується як показник забезпеченості карнітином організму в цілому. Тому знижений рівень L-карнітину у головному мозку можна пояснити його низькою біодоступністю внаслідок порушеного біосинтезу та, не виключено, низькою активністю мембранних транспортерів карнітину.

У мітохондріях, виділених з мозку діабетичних щурів, на 21% підвищувалась флуоресценція Rh123, що вказує на зниження їх мембранного потенціалу (рис. 2). Ці зміни супроводжувалися зниженням вмісту АТФ у синаптосомах головного мозку щурів (рис. 3), що може свідчити про індуковані діабетом порушення у функціонуванні електронно-транспортного ланцюга та енергетичного спряження процесу перенесення електронів із синтезом АТФ (окисне фосфорилування АДФ).

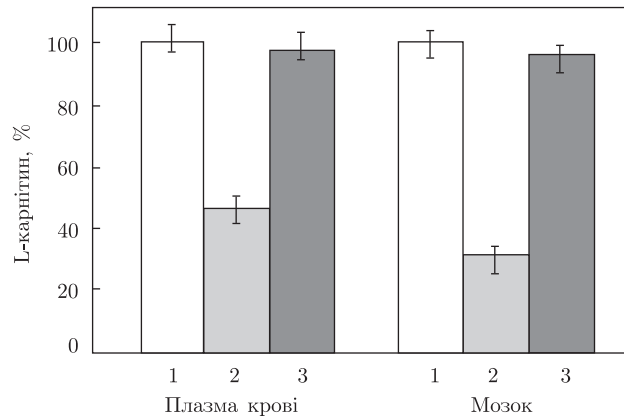


Рис. 1. Загальний вміст L-карнітину в плазмі крові та гомогенаті мозку; $M \pm m$, $n = 5-7$. Тут і на рис. 2, 3: 1 – контроль; 2 – діабет (Д); 3 – Д + АL-карнітин. Плазма: $(53,5 \pm 4,7)$ нмоль/мл; мозок: $(1,3 \pm 0,1)$ нмоль/мг білка (прийнято за 100%)

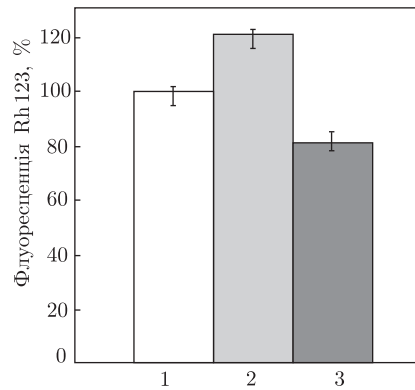


Рис. 2. Мітохондріальний мембранний потенціал ($\Delta\psi$); $M \pm m$, $n = 5$

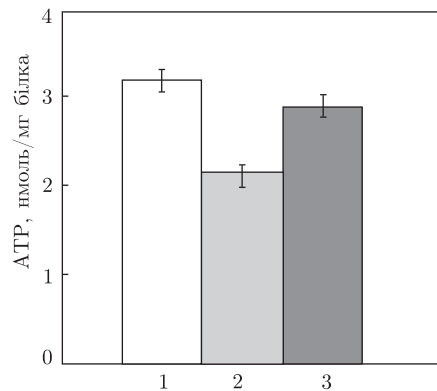


Рис. 3. Вміст АТР у синапсозомах мозку; $M \pm m$, $n = 5-7$

Відомо, що ацетил-L-карнітин впливає на холінергічну трансмісію головного мозку [12], тому важливим є вивчення впливу та можливого моделювального ефекту ацетил-L-карнітину на вивільнення синапсозомами головного мозку інших нейромедіаторів, зокрема серотоніну. В порівнянні з контролем, розвиток діабету призвів до 40,3% підвищення спонтанного

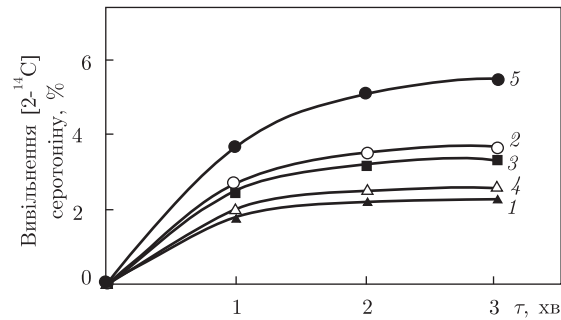


Рис. 4. Вивільнення $[2-^{14}\text{C}]$ серотоніну із синапсомом головного мозку щурів ($M \pm m$). Результати представлені як процент вивільнення $[2-^{14}\text{C}]$ серотоніну від загального $[2-^{14}\text{C}]$ серотоніну (серотонін у синапсомом + серотонін, що секретується). 1 – контроль (К); 2 – К + 30 ммоль/л КСІ; 3 – діабет (Д); 4 – Д + АL-карнітин; 5 – Д + 30 ммоль/л КСІ

вивільнення серотоніну синаптичними закінченнями (рис. 4). Це супроводжувалось зниженням активності Na^+, K^+ -АТРази в синаптичних мембранах до $(4,83 \pm 1,08)$ у порівнянні з $(6,95 \pm 1,49)$ мкмоль $\text{P}_{\text{неорган.}}$ за годину на міліграм білка у контролі. Відомо, що ефективне функціонування Na^+, K^+ -помпи сприяє створенню градієнтів одновалентних катіонів через цитоплазматичну мембрану, визначаючи величину мембранного потенціалу, яка зумовлює динамічність процесів зворотного поглинання та вивільнення нейромедіаторів синаптичними закінченнями [13]. Зниження активності Na^+, K^+ -АТРази можна пояснити встановленим дефіцитом АТР та виявленим триразовим зростанням вмісту сорбітолу мозку (не наведено), який порушує осмолярність клітин та розподіл одновалентних катіонів усередині та ззовні клітини.

Результатом як внутрішньоклітинного акумулювання сорбітолу, так і зниження активності Na^+, K^+ -АТРази може бути зниження трансмембранного цитоплазматичного потенціалу нервових закінчень. У свою чергу, можна припустити, що підвищене вивільнення серотоніну за даної патології індукується змінами трансмембранного цитоплазматичного потенціалу [14].

Індуковане *in vitro* калієвою деполаризацією вивільнення серотоніну було в два рази вищим за діабет у порівнянні з контролем (див. рис. 4). Це свідчить про те, що вивільнений серотонін при дії КСІ переважно походить з його везикульованого пулу та може вказувати на підвищену за умов ЦД нейросекрецію серотоніну.

Потенційна терапевтична роль ацетилкарнітину в лікуванні церебральної ішемії, яка супроводжує розвиток діабетичної нейропатії, полягає у впливі на механізми, що включають більш швидке відновлення та покращення енергетичного обміну мозку, а також зниження рівня L-карнітину протягом ранньої постішемичної реперфузії [15]. Дійсно, введення АL-карнітину призводило до відновлення вмісту L-карнітину в плазмі крові та головному мозку (див. рис. 1) та значно зменшувало мітохондріальні дисфункції, підвищуючи як мембранний потенціал мітохондрій (див. рис. 2), так і вміст АТР (див. рис. 3).

Таким чином, встановлено, що введення АL-карнітину частково нормалізувало Na^+, K^+ -АТРазну активність ($(6,50 \pm 1,70)$ мкмоль $\text{P}_{\text{неорган.}}$ за годину на міліграм білка) та спонтанне вивільнення серотоніну (див. рис. 4). Проте АL-карнітин практично не впливав на індуковане КСІ вивільнення серотоніну при діабеті (не наведено). Слід відзначити, що індукована КСІ деполаризація та вивільнення серотоніну є АТР-незалежним процесом. Під дією високих концентрацій КСІ спостерігається його прямий вплив на мембранний по-

тенціал через зміну іонних потоків. Отже, різний вплив хронічного введення AL-карнітину на спонтанне та індуковане KCl вивільнення серотоніну вказує на його здатність модифікувати переважно ті мембранноасоційовані процеси, які залежать від рівня клітинного енергоутворення. Нами не виявлено будь-якого істотного впливу AL-карнітину на рівень глюкози в плазмі крові та рівень сорбітолу в головному мозку.

Встановлення тісного взаємозв'язку між порушеним енергетичним метаболізмом та процесом вивільнення серотоніну свідчить про важливу роль мітохондрій в індукції дисфункцій нервових закінчень при цукровому діабеті. Позитивна нейромодуляторна дія AL-карнітину на серотонінергічну медіаторну систему переважно може опосередковуватися його нормалізуючим впливом на енергетичний метаболізм.

1. Adili F., Larjani B., Haghghatpanah M. Diabetic patients: Psychological aspects // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2006. – 1084. – P. 329–349.
2. Nicholls D. G. Bioenergetics and transmitter release in the isolated nerve terminal // Neurochem. Res. – 2003. – **10**. – 1433–1441.
3. Wolfgang M., Kurama T., Dai Y. et al. The brain-specific carnitine palmitoyltransferase – 1c regulates energy homeostasis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – **103**, No 19. – P. 7282–7287.
4. Mingrone G. Carnitine in type 2 diabetes // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2004. – 1033, No 99–107. – P. 5121–5126.
5. Hagen T. M., Wehr C. M., Ames B. N. Mitochondrial decay in aging. Reversal through supplementation of acetyl-L-carnitine and N-tert-butyl-alpha-phenyl-nitron // Ibid. – 1998. – **20**, No 854. – P. 214–223.
6. Abita I. P., Chicheportiche R., Schweitz M. Effect of neurotoxins (veratridine, sea anemonetoxin, tetrodotoxin) on transmitter accumulation. Release by nerve terminals in vitro // Biochem. – 1977. – **16**, No 9. – P. 1838–1864.
7. Mitsuko O., Kazunori M., Michihiro F. Differential calcium dependence between the release of endogenous dopamine and noradrenaline from rat brain synaptosomes // J. Neurochem. – 1990. – **54**, No 6. – P. 1947. – 1952.
8. Zhao Kesheng, Zhao Guo-Min, Wu D. et al. Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling oxidative cell death, and reperfusion injury // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**, No 33. – P. 34682–34690.
9. Rathbun W. B., Betlach M. V. Estimation of enzymatically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate // Anal. Biochem. – 1969. – **28**, No 1–3. – P. 436–445.
10. Cederblad G, Lindstedt S. A method for the determination of carnitine in the picomol range // Clin. Chim. Acta. – 1972. – **37**. – P. 235–243.
11. Bergmeyer H. U. Methods of Enzymatic Analysis. – New York: Verlag Chemie, Weinheim. – 1974. – Vol. 4. – 2300 p.
12. Drago F., Continella G., Pennisi G. et al. Behavioral effects of acetyl-L-carnitine in the male rat // Pharmacol Biochem Behav. – 1986. – **24**, No 5. – P. 1393–1396.
13. Therien A. G., Blostein R. Mechanisms of sodium pump regulation // Amer. J. Phys. Cell. Physiol. – 2000. – **279**. – C. 541–566.
14. Tuz K., Peca-Segura C., Franco R., Pasantes-Morales H. Depolarization, exocytosis and amino acid release evoked by hyposmolarity from cortical synaptosomes // Eur. J. Neurosci. – 2004. – **19**, No 4. – P. 916–924.
15. Ido Y., McHowat J., Chang K. C. et al. Neural dysfunction and metabolic imbalances in diabetic rats. Prevention by acetyl-L-carnitine // Diabetes. – 1994. – **43**, No 12. – P. 1469–1477.

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ
Національний медичний університет
ім. О. О. Богомольця, Київ

Надійшло до редакції 20.12.2007