

Активация апоптозу антагоністами тіаміну в астроцитах щурів

С. А. Чорний, Ю. М. Пархоменко

Інститут біохімії ім. Палладіна НАН України
Вул. Леонтовича 9, Київ, 01601, Україна

sch_1982@yahoo.com

Представлено результати експериментів з дослідження in vitro реакції астроцитів щурів (клітини DITNC) на додавання до середовища інкубації відомих антагоністів тіаміну (вітаміну B₁). Використано такі антагоністи тіаміну: ампроліум, піритіамін та окситіамін. Результати дослідження на основі конфокальної лазерної сканувальної флуоресцентної мікроскопії показали, що інкубація клітин протягом 72 год з окситіаміном або піритіаміном призводить до вакуолізації клітинної мембрани, переміщення внутрішньомембранних фосфоліпідів на зовнішню поверхню мембрани та транслокації розщепленої каспази 3 до клітинного ядра. Методами імунофлуоресценції та Вестерн-блот-аналізу виявлено розщеплення каспази 3 в клітинах, інкубованих з піритіаміном та окситіаміном у концентраціях 100 мкМ. Ці дані підтверджують той факт, що інкубація клітин DITNC з піритіаміном та окситіаміном активує процеси апоптозу. За тих самих умов ампроліум не впливав значно на клітини DITNC.

Ключові слова: антагоністи тіаміну, окситіамін, піритіамін, ампроліум, апоптоз.

Вступ. Біологічно активна форма вітаміну B₁ (тіаміну) — тіаміндифосфат (TDP) є коферментом декількох ферментів вуглеводного обміну. Тому, беручи до уваги можливі метаболічні ушкодження в клітинах при дефіциті тіаміну та його коферментної форми, доцільно припустити, що окиснювальний стрес і супутній ацидоз є основними причинами нейродегенеративних змін і загибелі клітин, які спостерігаються за цих умов [1—9]. Однак, згідно із сучасними уявленнями, для нормального функціонування і підтримки життєдіяльності нервових клітин велике значення мають не лише коферментні, а й так звані некоферментні функції тіаміну [10, 11]. Про це свідчать дані щодо участі TDP і тіамінтрифосфату (TTP) у функціонуванні регуляторних ферментів піруватдегідрогеназного комплексу (кінази та фосфатази) [12], участі TTP як донора фосфату у фосфорилуванні одного із білків ацетилхолінового рецептора [13], можливого

залучення похідних тіаміну до регуляції функцій інших рецепторних систем. На жаль, питання стосовно некоферментних механізмів причетності тіаміну до функціонування клітин досліджено недостатньо. Але це не виключає можливості прямого (не опосередкованого коферментною функцією TDP) втручання тіаміну і його біологічно активних похідних у регуляцію процесів клітинного циклу. З'ясування цього питання є актуальним через те, що функціональні порушення залежних від тіаміну процесів в організмі людини при дефіциті вітаміну B₁ можуть бути одним із важливих патогенетичних факторів таких захворювань, як хвороба Альцгеймера [14, 15], синдром Верніке-Корсакова (енцефаломієлопатія Верніке) [4, 16, 17] та ін. Одним із експериментальних підходів при дослідженні подібних механізмів може бути використання агоністів та антагоністів тіаміну.

Метою цієї роботи є порівняльне дослідження дії на клітини астроцитів культури DITNC трьох

класичних антагоністів тіаміну: піритіаміну (ПТ), окситіаміну (ОТ) та ампроліуму (АМ), здатних пригнічувати різні ланки обміну вітаміну. Оскільки попередніми дослідженнями показано, що вищезазначені сполуки інгібують проліферацію цих клітин, нас цікавило, перш за все, за яким механізмом відбувається загибель клітин під впливом антагоністів тіаміну. Цю роботу ми розглядаємо як перший етап вивчення ролі тіаміну в регуляції процесів клітинного циклу.

Матеріали і методи. *Культура клітин.* Дослідження проведено на культурі клітин DITNC (первинні астроцити мозку щурів, штучно отриманих трансфекцією двох різних генів, гліального кислого фібрилярного білка людини та гена SV40) [18]. Ці клітини культивували в середовищі DMEM («Sigma», США) з додаванням 5 % сироватки ембріона великої рогатої худоби (FCIII) («Sigma») та антибіотиків (1 % стрептоміцину та 1 % пеніциліну) («Sigma»). В досліджах клітини культивували в середовищі DMEM із додаванням 1 % FCIII та одного з трьох антагоністів тіаміну: АМ, ОТ або ПТ («Sigma») в концентрації 100 мкМ. Культивування клітин тривало 72 год (температура 37 °С) за присутності 5 % CO₂. Діючі концентрації антагоністів та час інкубації підібрано на підставі попередніх дослідів із визначення кількості клітин, які виживали за умов експерименту, методом спектрофотометричного аналізу дегідрогеназної активності з МТТ реагентом (неопубліковані дані). Щоб отримати картину класичного апоптозу (позитивний контроль), клітини інкубували в середовищі DMEM з додаванням 1 % FCIII та 4 мкМ стауроспорину («Sigma») протягом 24 год. Негативним контролем слугували клітини, які інкубували у вищезгаданому середовищі без додавання будь-якого чинника.

Конфокальна лазерна флуоресцентна мікроскопія. Ознаки клітинного апоптозу виявляли за допомогою специфічного імунофлуоресцентного барвника — Annexin V-Alexa Fluor-568 («Molecular Probes», США), який зв'язується з фосфатидилсерином, транслокованим на зовнішню сторону мембрани в разі апоптозу [19]. Після інкубації предметне скло з клітинами поміщали в анексинзв'язувальний буфер, потім додавали флуоресцентний барвник Annexin V. Для забарвлення нуклеїнових кислот клітини обробляли барвником SYTOX Green stain («Molecular Probes»). Стан клітин оцінювали за допомогою сканувального лазерного конфокального мікроскопа Zeiss LSM-5 Pascal (Німеччи-

на) при $\times 10$, $\times 40$ та $\times 100$ з використанням імерсійного масла. Емісію барвника SYTOX Green stain спостерігали через BP505-530 фільтр за допомогою аргонного лазера, емісію йодистого пропідіуму та барвника Annexin V-Alexa Fluor 568 — через LP560 фільтр за допомогою неонових лазерів.

Для визначення в клітинах продукту розщеплення каспази 3 — великого фрагмента розміром 19 кДа [7] методом імунофлуоресценції препарати готували так само, як і в попередньому досліді [19], але замість барвника використовували поліклональні антитіла до розщепленої каспази 3, зв'язані з флуоресцеїном («Cell Signaling Technology», США) у співвідношенні 1:100. Згідно з інформацією компанії-виробника, ці антитіла отримано імунізацією кролів синтезованим пептидом, який відповідає амінокислотним залишкам навколо аспарагіну 175, — ділянки розщеплення каспази 3 у щурів.

Клітинну локалізацію розщепленої каспази 3 оцінювали за допомогою сканувального лазерного конфокального мікроскопа Zeiss при збільшенні в 10 разів з використанням імерсійного масла. Емісію антитіл, зв'язаних з флуоресцеїном, спостерігали через BP505-530 фільтр за допомогою аргонного лазера.

Вестерн-блот-аналіз. Розщеплення каспази 3 також визначали методом Вестерн-блот-аналізу [8], використовуючи первинні поліклональні антитіла: «rabbit anti-rat» до розщепленої каспази 3, «rabbit anti-rat» до каспази 3 та вторинні антитіла — «goat anti-rabbit» IgG, кон'юговані з пероксидазою хрому, придбані у «Cell Signaling Technology». Перед інкубацією клітини розсівали у шестикоміркові планшети, у кожній комірці по 1 млн клітин (умови інкубації див. вище). Після інкубації планшети з клітинами переносили на лід і додавали в кожен комірці по 50 мкл буфера для лізису. Клітини суспендували в буфері, потім переносили в 1,5 мл-пробірки і витримували протягом 1 год (4 °С). Центрифугували при 13000 g за температури 4 °С упродовж 10 хв на центрифугі Beckman Coulter (США). Надосадову рідину відбирали, переносили в нові пробірки і додавали буфер, який містив 187,5 мкМ трис-НСl, рН 6,8, 6 %-й DS-Na, 0,003 %-й бромфеноловий синій, 1,8 %-й β -меркаптоетанол, кількість буфера складала половину об'єму зібраної надосадової рідини. Суміш кип'ятили протягом 5 хв, потім швидко охолоджували до температури 4 °С. Кількість білка в пробах

визначали методом Бредфорда [23], наносили по 100 мкг у лунку на 10 %-й поліакриламідний гель, в окрему лунку вносили 5 мкл розчину маркерів і проводили диск-електрофорез. За допомогою апарату для напівсухого перенесення Trans Blot SD («Semi Dry Transfer Cell», «Bio-Rad», США) розділені білки і маркери з геля переносили на нітроцелюлозну мембрану протягом 1,5 год за постійної напруги 15 В. Мембрану переносили у буфер для блокування (5 % знежиреного молока в TBST буфері, рН 7,4–7,6) та інкубували упродовж 1 год, інтенсивно перемішуючи за кімнатної температури. Склад TBST буфера: 100 мкМ трис-НCl, 1 М NaCl, 0,1 %-й твін 20 («Sigma»). Далі мембрану промивали один раз у TBST-буфері, додавали 10 мл буфера для блокування та по 10 мкл (1:1000) первинних антитіл до розщепленої та нерозщепленої каспази 3 і інкубували протягом 17 год за температури 4 °С при інтенсивному перемішуванні. Після зупинки інкубації мембрану промивали тричі по 5 хв у буфері TBST і додавали 20 мл буфера для блокування і 10 мкл (1:2000) вторинних антитіл. Мембрану інкубували (1 год) за кімнатної температури, промивали буфером TBST тричі по 5 хв. Нітроцелюлозну мембрану занурювали на 5 хв у розчин для виявлення білків, який готували, змішуючи 0,5 мл LumiGLO™ (хемілюмінесцентний субстрат («PIERCE Biotechnology», США)), 0,5 мл H₂O₂ та 0,9 мл дистильованої води. Хемілюмінесцентне мічення білків сканували за допомогою приладу GS-525 («Molecular Imager», США). Результати аналізували за допомогою програми Quantity One software («Bio-Rad»), яка дозволяє визначати відносну інтенсивність забарвлення білкових смуг у контрольній та дослідних пробах. При цьому отримані показники відносної інтенсивності забарвлення смуг у дослідних зразках виражали у відсотках стосовно показників відносної інтенсивності забарвлення смуг контрольних проб.

Статистична обробка результатів. Дані у трьох повторностях статистично оброблено за допомогою програм Quantity One («Bio Rad») і Prism 4 («Graph Pad», США) та подано у вигляді графіка, побудованого на основі отриманих середньоарифметичних і стандартних відхилень, перерахованих у відсотки відносно 100 % контролю. Достовірність різниці середніх (p) визначали за критерієм Ст'юдента.

Результати і обговорення. Першим кроком у виявленні ознак апоптозу клітин DITNC при їхній

інкубації з антагоністами тіаміну було проведення конфокальної лазерної флуоресцентної мікроскопії необроблених і оброблених стауроспорином клітин для встановлення негативного та позитивного контролів на апоптоз (рис. 1). Відомо, що стауроспорин спричинює клітинний апоптоз уже через 24 год інкубації [20], тому саме такі клітини використовували як позитивний контроль на апоптоз. Як видно із даних рис. 1, б, у разі негативного контролю клітини не реагують з барвником Annexin V-Alexa Fluor-568. Ядра цих клітин залишилися морфологічно не зміненими з чітко вираженими ядерецями (рис. 1, а). Всі ознаки свідчать про відсутність апоптозу клітин у цій культурі. У той же час інкубація клітин з 4 мкМ стауроспорином дає позитивне забарвлення на Annexin V і викликає деструкцію ядер у клітинах DITNC протягом 1 доби (рис. 1).

Після встановлення позитивного та негативного контролів на апоптоз здійснено конфокальну лазерну флуоресцентну мікроскопію клітин, інкубованих протягом 72 год з антагоністами тіаміну (рис. 2). Як свідчать результати аналізу, АМ в концентрації 100 мкМ не викликав морфологічних змін у ядрах клітин, також не спостерігалось транслокації фосфатидилсерину на зовнішній бік мембрани (рис. 2, А). Зовнішній вигляд клітин залишався подібним до негативного контролю на апоптоз. На відміну від АМ інкубація клітин з ОТ у тій же концентрації викликала чітку реструктуризацію клітинних мембран (рис. 2, Б, б). Кількість позитивно забарвлених Annexin V клітин у полі зору мікроскопу при $\times 40$ становила приблизно 89 %. Відсутність ядерець свідчить про початок деградації ядер.

Інкубація клітин з ПТ, як і в разі з ОТ, спричинює деструктуризацію плазматичних мембран у приблизно 87 % клітин, що підтверджують дані, наведені на рис. 2, В. Чітко видно відсутність ядерець та спрямованість забарвленості фосфатидилсерину назовні клітини, тобто інкубація зі 100 мкМ ПТ дає той самий ефект на DITNC клітини, як із 100 мкМ ОТ.

Відомо, що при апоптозі відбувається вакуолізація клітинної мембрани [19]. Враховуючи це, для детальнішого аналізу змін у структурі плазматичних мембран клітин за допомогою конфокального мікроскопу було зроблено декілька знімків у 100-кратному збільшенні (рис. 3). Аналіз дії ОТ, ПТ та стауроспоринолу при такому збільшенні вия-

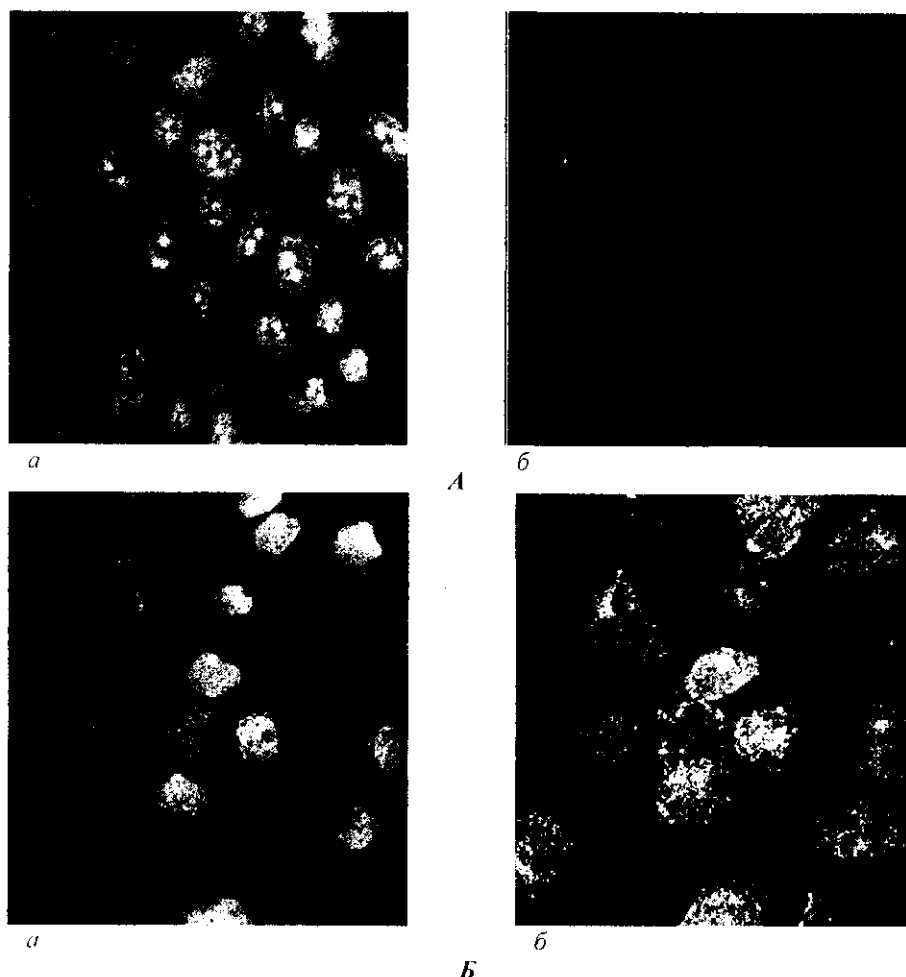


Рис. 1. Конфокальна лазерна флуоресцентна мікроскопія необроблених та оброблених стауроспорином клітин DITNC: А — негативний контроль на апоптоз (необроблені клітини); Б — позитивний контроль на апоптоз (клітини, оброблені 4 мкМ стауроспорином) (а — забарвлення ДНК ядра SytoXyugreen барвником; б — забарвлення зовнішнього мембранного фосфатидилсерину барвником Annexin V-Alexa Fluor-568). $\times 40$

вив вакуолізацію клітинних мембран, тобто в астроцитів дефіцит тіаміну, викликаний ОТ та ПТ, на третій день спричиняє ознаки, характерні для ранніх стадій апоптозу.

Майже всі відомі шляхи розвитку апоптозу потребують розщепленої каспази 3. Щоб виявити, чи активується каспаза 3 в клітинах при інкубації їх з антагоністами тіаміну, ми провели дослідження з використанням імунофлуоресцентного аналізу (ІФА) та Вестерн-блотингу з антитілами до розщепленої каспази 3.

На рис. 4 зображено дані, отримані в результаті ІФА DITNC клітин на 3-й день інкубації зі 100 мкМ АМ, ОТ і ПТ. Вони свідчать, що при дії ПТ та ОТ каспаза 3 транслокується до ядра так само, як при обробці клітин 4 мкМ стауроспорином. 100 мкМ АМ не впливав на активацію розщеплення каспази 3 та її транслокацію до ядра, як це має місце в необроблених клітинах. Для підтвердження даних, отриманих за допомогою ІФА,

контрольні DITNC клітини та ті, що інкубували з антагоністами тіаміну, проаналізовано за методом Вестерн-блотингу на присутність розщепленої каспази 3. Розщеплену та нерозщеплену каспазу 3 ідентифікували за допомогою специфічних антитіл (див. «Матеріали і методи»).

На рис. 5 наведено результати Вестерн-блот-аналізу зразків білків, одержаних з клітин, які обробляли антагоністами тіаміну. На графіку зображено результати кількісної оцінки інтенсивності забарвлення смуг, одержаних після Вестерн-блот-аналізу, яку проводили відносно інтенсивності смуг контролю.

Аналіз з антитілами до розщепленої каспази 3 показав, що інкубація клітин за присутності ПТ або ОТ призводить до посилення розщеплення каспази 3, яке супроводжується збільшенням відносної інтенсивності смуг, що відповідають великій субодиниці розміром 19 кДа. Дія ПТ та ОТ була подібною до такої стауроспорино, проте у випадку

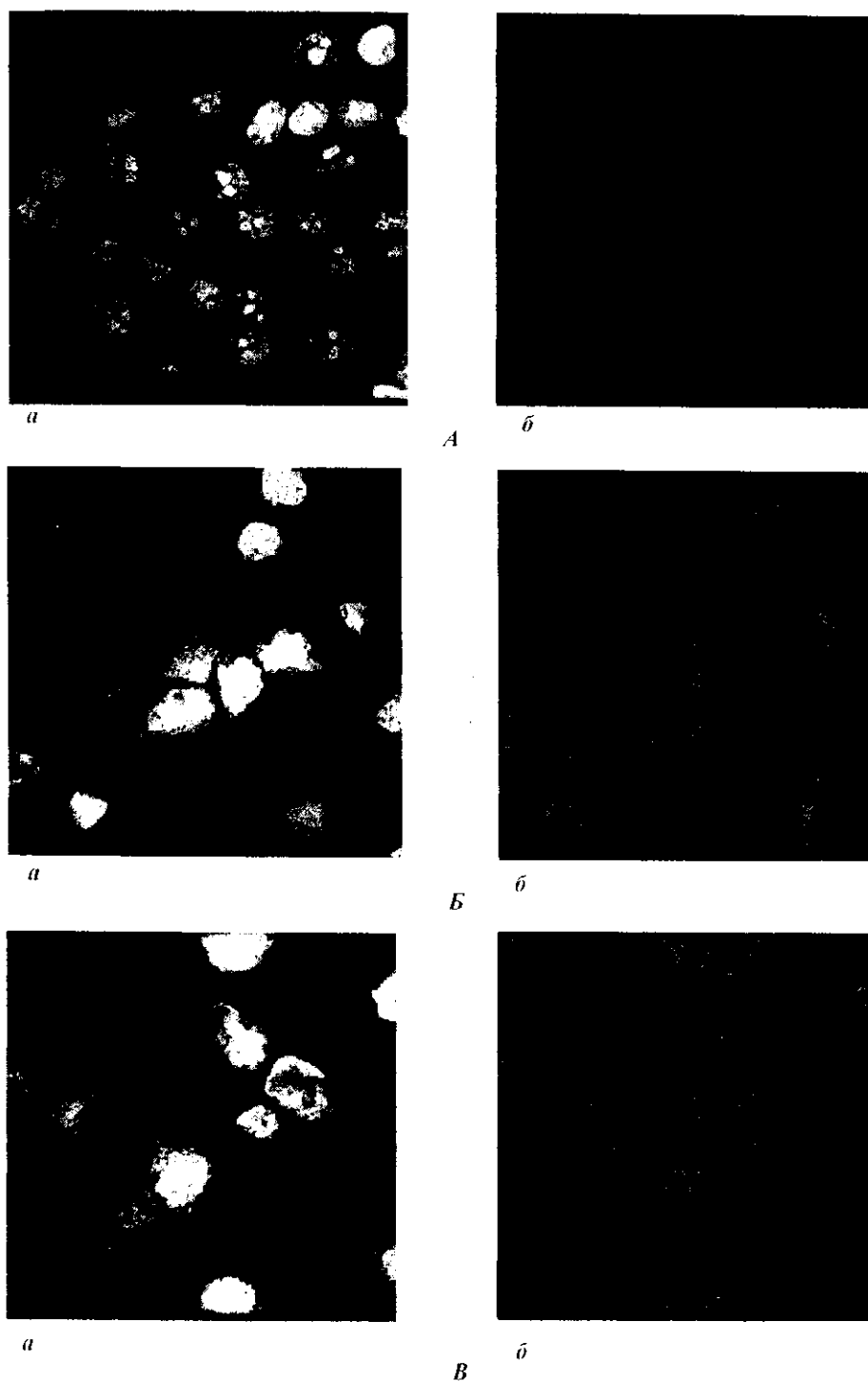


Рис. 2. Конфокальна лазерна флуоресцентна мікроскопія DITNC клітин на третій день інкубації після обробки 100 мкМ ампроліумом (А), окситіаміном (Б) та піритіаміном (В) (а — забарвлення ДНК ядра Сутохугресп барвником; б — забарвлення зовнішнього мембранного фосфатидилсерину барвником Annexin V-Alexa Fluor-568). ×40

останнього ми не знайшли слідів нерозщепленої каспази 3. Цей феномен можна пояснити тим, що стауроспорин є швидкодіючим активатором апоптозу і через 24 год відбувається майже повне розщеплення каспази 3 [20].

Слід відмітити, що за умов нашого експерименту рівень відносної інтенсивності смуг нерозщепленої каспази 3 після інкубації клітин за присутності ПТ або ОТ близький до такого ж показника для контрольних клітин. Подібну картину

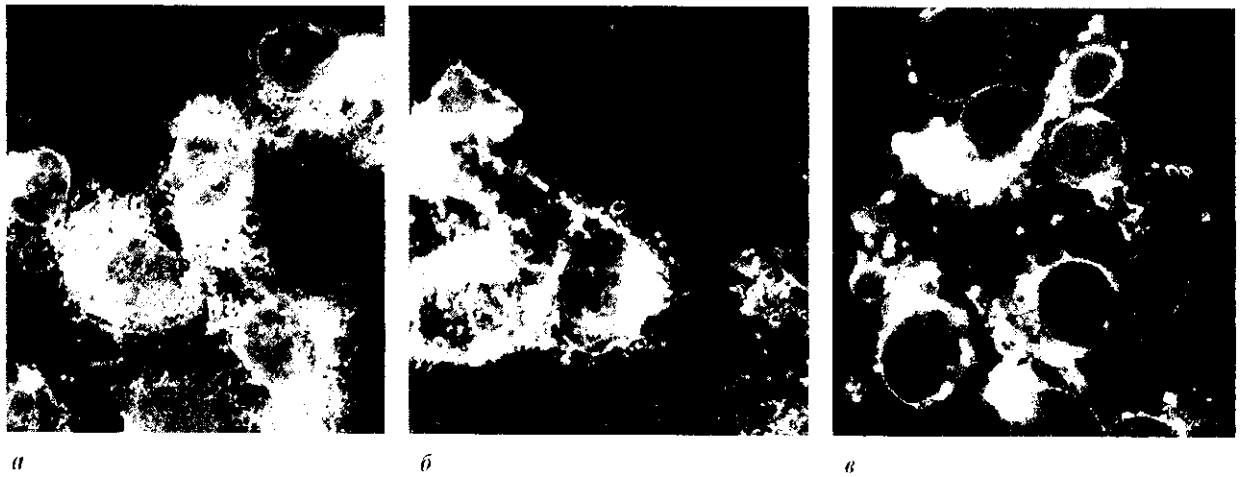


Рис. 3. Ознаки вакуолізації мембран DITNC клітин після впливу: *a* — 100 мкМ окситіаміну (3-й день інкубації); *б* — 100 мкМ піритіаміну (3-й день інкубації); *в* — 4 мкМ стауроспорину (1-й день інкубації). Знімки отримано методом конфокальної лазерної флуоресцентної мікроскопії з використанням барвника Applexin V-Alexa Fluor-568. $\times 100$

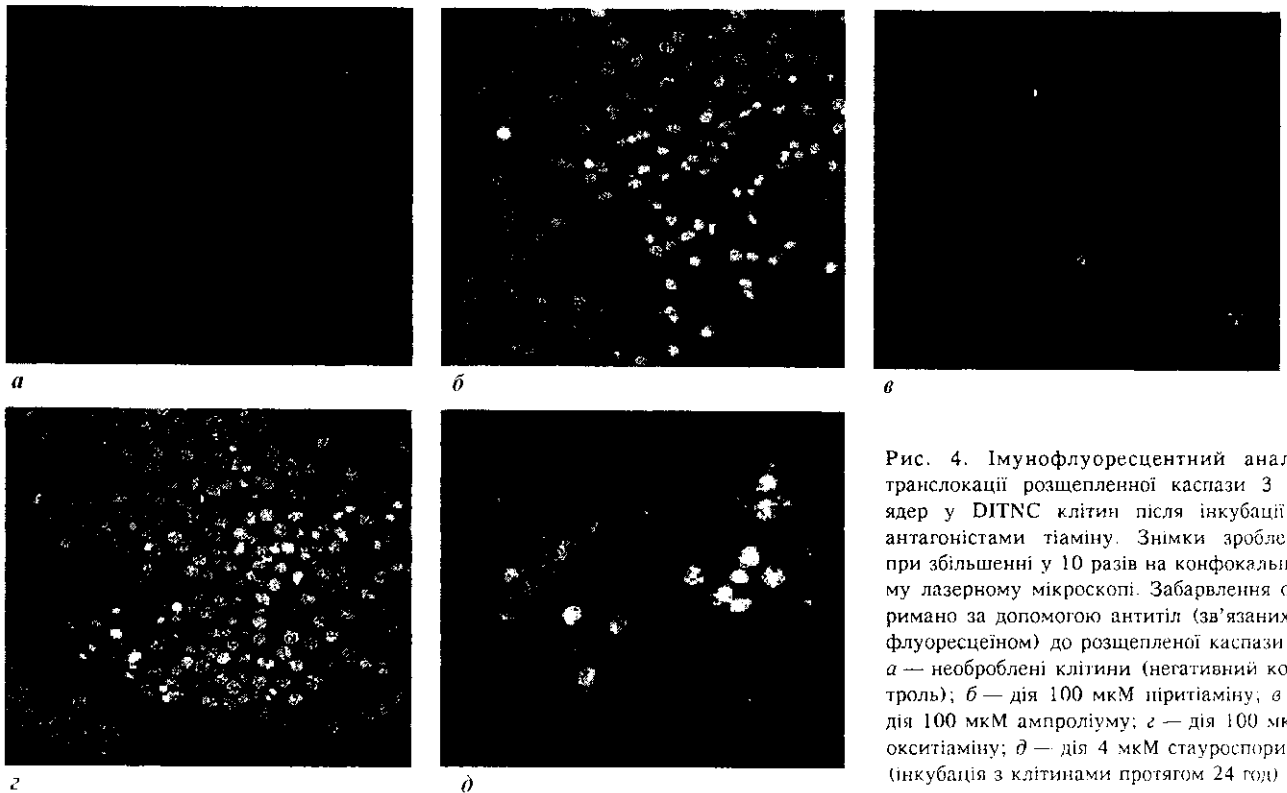
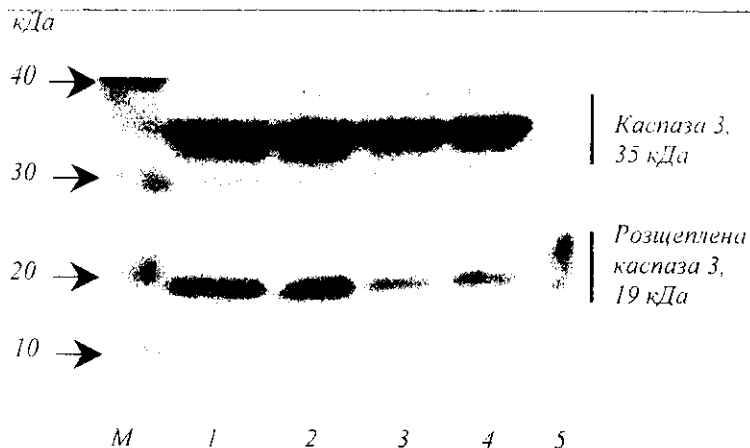


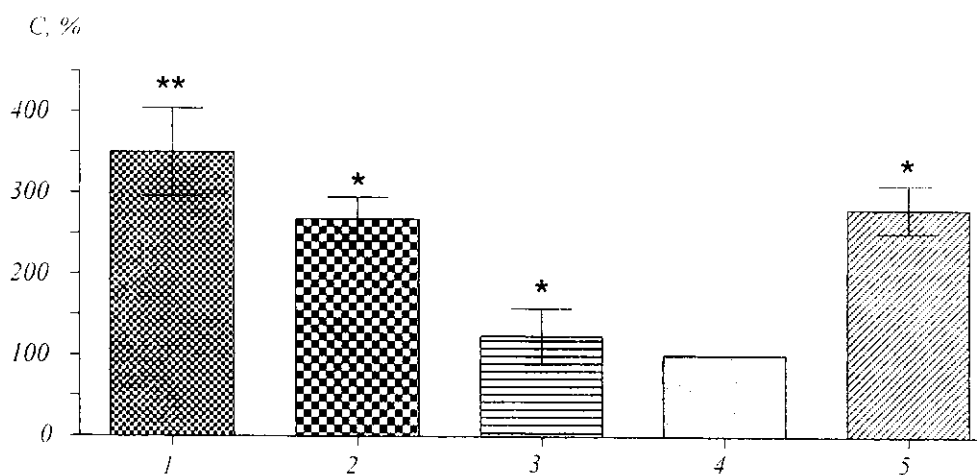
Рис. 4. Імунофлуоресцентний аналіз транслокації розщепленої каспази 3 до ядер у DITNC клітин після інкубації з антагоністами тіаміну. Знімки зроблено при збільшенні у 10 разів на конфокальному лазерному мікроскопі. Забарвлення отримано за допомогою антитіл (зв'язаних з флуоресцеїном) до розщепленої каспази 3: *a* — необроблені клітини (негативний контроль); *б* — дія 100 мкМ піритіаміну; *в* — дія 100 мкМ ампроліуму; *г* — дія 100 мкМ окситіаміну; *д* — дія 4 мкМ стауроспорину (інкубація з клітинами протягом 24 год) як позитивний контроль на апоптоз

спостерігали й інші дослідники, які використовували різні індуктори апоптозу на культурах ракових клітин [21], дехто з них припускає, що ці чинники можуть підвищувати рівень експресії гену згаданого білка [22]. Наведені на рис. 5 дані свідчать, що

необроблені клітини також містять невелику кількість розщепленої каспази 3. Цей факт можна пояснити тим, що процеси апоптозу проходять на певному фізіологічному рівні в кожній популяції клітин.



a



б

Дефіцит тіаміну, викликаний інкубацією клітин в середовищі з ПТ та ОТ, призводить до інтенсифікації розщеплення каспази 3 відповідно до 350,18±53,95 % ($p < 0,01$) і 268,14±26,73 % ($p < 0,5$) порівняно з контролем. Різниця між ефектом цих двох сполук відносно контролю є достовірною ($p < 0,01$ і $p < 0,5$) та приблизно в три рази перевищує дані контролю. Ці дані свідчать про майже однаковий вплив ПТ та ОТ на активацію апоптозу у клітин DITNC. У той же час при інкубації клітин з АМ рівень розщеплення каспази 3 становить лише 123,40±34,68 % ($p < 0,5$) від контролю, тобто різниця з останнім не є суттєвою.

Аналізуючи дані, отримані у цьому дослідженні, слід брати до уваги специфіку дії кожного з використаних антагоністів на обмін тіаміну. Так, АМ є інгібітором транспорту тіаміну. Блокуючи транспорт вітаміну до клітини, він не проникає

далі і не втручається у внутрішньоклітинний обмін тіаміну і його фосфатів. Тобто протягом інкубації клітин у середовищі з цією сполукою вони використовують переважно той пул тіаміну, що міститься у вихідних клітинах. Як випливає з одержаних даних, його досить для підтримання життєдіяльності клітин за умов нашого експерименту. Піритіамін також конкурує з тіаміном при транспортуванні, але до того ж він проникає крізь плазматичну мембрану і взаємодіє з тіамінкіназою, першим ферментом на шляху внутрішньоклітинного обміну тіаміну. Це похідне є сильним інгібітором тіамінкінази і відповідно синтезу коферменту — TDP [24]. Згідно з даними літератури, він здатний також утворювати антикофермент — піритіаміндіфосфат, але в незначній кількості і його гальмувальний вплив на TDP-залежні ферменти є слабким. Між тим, саме піритіамін є найсильнішим

Рис. 5. Вестерн-блот-аналіз впливу антагоністів тіаміну на розщеплення каспази 3 у DITNC клітинах з використанням антитіл до розщепленої і нерозщепленої каспази 3 (див. «Матеріали і методи»): а — знімок нітроцелюлозної мембрани, який зображує зв'язування каспази 3 та її великої субодиниці (19 кДа) у вигляді смуг; б — графік співвідношення відносної інтенсивності забарвлення смуг на знімку (а), які відповідають розщепленій каспазі 3 зразків, до відносної інтенсивності забарвлення контрольної смуги (необроблені клітини); 1 — дія 100 мкМ піритіаміну; 2 — дія 100 мкМ окситіаміну; 3 — дія 100 мкМ ампроліуму; 4 — контроль; 5 — дія 4 мкМ стауроспорину; М — маркер; С, % — розщеплення каспази 3 за умов дефіциту тіаміну (% відносно контролю); ** $p < 0,01$; * $p < 0,5$

антагоністом вітаміну B₁ і на відміну від інших антагоністів у досліджах *in vivo* на тваринах він майже повністю імітує неврологічні ускладнення, що розвиваються при паралітичній формі бері-бері. Як і піритіамін, окситіамін здатний проникати крізь плазматичну мембрану. Він також взаємодіє з тіамінкіназою (але майже не гальмує її) і здатний утворювати антикофермент окситіаміндифосфат і далі — окситіамінтрифосфат. Тобто це похідне спричинює «найглибше» гальмування ферментативних реакцій, залежних від TDP [24]. Таким чином, якщо оцінювати з позиції коферментних механізмів дію на клітинний метаболізм двох антагоністів тіаміну — піритіаміну і окситіаміну — саме останній має викликати виразніший оксидативний стрес у клітинах за інших рівних умов.

Узагальнюючи вищевикладені результати дослідження впливу трьох антагоністів тіаміну на життєздатність астроцитів, можна зробити висновок стосовно того, що ПТ і ОТ, які є антагоністами вітаміну B₁ на рівні його участі у певних процесах внутрішньоклітинного метаболізму, викликають апоптоз у досліджуваних клітин. АМ, дія якого обмежується пригніченням транспорту тіаміну в клітини, за умов експерименту не викликав апоптозу в астроцитах. Для з'ясування механізму участі тіаміну та його похідних у сигнальних механізмах клітини потрібні подальші дослідження, у тому числі дослідження на інших типах клітин, зокрема, враховуючи високу нейротропність тіаміну, на нейрональних клітинах.

Автори щиро вдячні д-ру Фернандо А. Гонзалесу (Пуерто Ріко, США) за допомогу у виконанні даної роботи.

S. A. Chorny, Yu. M. Parkhomenko

Apoptosis activation in rat astrocyte cells caused by antagonists of thiamine

Summary

The experimental results of in vitro investigation of rat astrocytes (DITNC cells) reaction to the addition of well-known thiamine (vitamin B₁) antagonists into the incubation medium are represented. The following antagonists of thiamine — amprolium, pyri-thiamine, and oxythiamine were used. Confocal laser scanning fluorescent microscopy has revealed that 72 hours incubation of cells with oxythiamine or pyri-thiamine results in cell membrane vacuolization, externalization of membrane phospholipids and translocation of cleaved caspase 3 to the nucleus. Cleavage of caspase 3 in the cells that incubated with 100 μM concentration of oxythiamine and pyri-thiamine was determined by Western blotting and immunofluorescence methods. These data prove that incubation of DITNC cells with oxythiamine and pyri-thiamine caused the activa-

tion of apoptosis processes. At the same conditions amprolium did not influence DITNC cells significantly.

Keywords: thiamine antagonists, oxythiamine, pyri-thiamine, amprolium, apoptosis.

S. A. Chorny, Yu. M. Parkhomenko

Apoptosis activation in rat astrocyte cells caused by antagonists of thiamine

Summary

The experimental results of in vitro investigation of rat astrocytes (DITNC cells) reaction on adding into the medium of incubation well-known thiamine (vitamin B₁) antagonists are represented in the work. The following antagonists of thiamine — amprolium, pyri-thiamine and oxythiamine were used. Confocal laser scanning fluorescent microscopy has revealed that 72 hours cells incubation with oxythiamine or pyri-thiamine results in cell membrane blebbing, externalization of membrane phospholipids and translocation of cleaved caspase 3 to the nucleus. Cleavage of caspase 3 in cells that incubated with 100 μM concentration of oxythiamine and pyri-thiamine was determined by Western blot and immunofluorescence methods. These data suggest that incubation of DITNC cells with oxythiamine and pyri-thiamine caused activation of apoptosis process. In the same conditions amprolium did not significantly influence on DITNC cells.

Key words: thiamine antagonists, oxythiamine, pyri-thiamine, amprolium, apoptosis.

С. А. Чорный, Ю. М. Пархоменко

Активация апоптоза антагонистами тиамин в астроцитах крыс

Резюме

Представлены результаты экспериментов по исследованию in vitro реакции астроцитов крыс (клетки DITNC) на добавление в среду инкубации известных антагонистов тиамин (витамина B₁). Использовали следующие антагонисты тиамин: ампролиум, пиритиамин и окситиамин. Результаты исследования на основе конфокальной лазерной сканирующей флуоресцентной микроскопии показали, что инкубация клеток на протяжении 72 ч с окситиамином или пиритиамином приводит к вакуолизации клеточной мембраны, переходу внутримембранных фосфолипидов на внешнюю поверхность мембраны и транслокации расщепленной каспазы 3 в клеточное ядро. Методами иммунофлуоресценции и Вестерн-блот-анализа выявлено расщепление каспазы 3 в клетках, инкубированных с пиритиамином и окситиамином в концентрациях 100 мкМ. Эти данные подтверждают тот факт, что инкубация DITNC клеток с пиритиамином и окситиамином активирует процессы апоптоза. В тех же условиях ампролиум не влиял значительно на клетки DITNC.

Ключевые слова: антагонисты тиамин, окситиамин, пиритиамин, ампролиум, апоптоз.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Frederikse P. H., Farnsworth P., Zigler J. S., Jr. Thiamine deficiency in vivo produces fiber cell degeneration mouse lenses // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1999.—258.—P. 703—707.
2. Stagg A. R., Fleming J. C., Baker M. A., Sakamoto M., Cohen N., Neufeld E. J. Defective high-affinity thiamine transporter leads to cell death in thiamine-responsive mega-

- loblastic anemia syndrome fibroblasts // *J. Clin. Invest.*—1999.—103.—P. 723—729.
3. Paek L. C., Colingasan N. Y., Uchida K., Zhang H., Gibson G. E. Metabolic impairment elicits brain cell type selective changes in oxidative stress and cell death in culture // *J. Neurochem.*—2000.—74.—P. 114—124.
 4. Pannunzio P., Hazell A. S., Pannunzio M., Rao K. V., Butterworth R. F. Thiamine deficiency results in metabolic acidosis and energy failure in cerebellar granule cells: an *in vitro* model for the study of cell death mechanisms in Wernicke's encephalopathy // *J. Neurosci. Res.*—2000.—15.—P. 286—292.
 5. Calingasan N. Y., Gibson G. E. Dietary restriction attenuates the neuronal loss, induction of heme oxygenase-1 and blood-brain barrier breakdown induced by impaired oxidative metabolism // *Brain Res.*—2000.—885.—P. 62—69.
 6. Kruse M., Navarro D., Desjardins P., Butterworth R. F. Increased brain endothelial nitric oxide synthase expression in thiamine deficiency: relationship to selective vulnerability // *Neurochem. Int.*—2004.—45.—P. 49—56.
 7. Park L. C., Calingasan N. Y., Uchida K., Zhang H., Gibson G. E. Metabolic impairment elicits brain cell type-selective changes in oxidative stress and cell death in culture // *J. Neurochem.*—2000.—74.—P. 114—124.
 8. Rais B., Comin B., Puigjaner J., Brandes J. L., Creppy E., Saboureau D., Ennamany R., Lee W. N., Boros L. G., Cascante M. Oxythiamine and dehydroepiandrosterone induce a G1 phase cycle arrest in Ehrlich's tumor cells through inhibition of the pentose cycle // *FEBS Lett.*—1999.—456.—P. 113—118.
 9. Wang J. J., Hua Z., Fentress H. M., Singleton C. K. JNK1 is inactivated during thiamine deficiency-induced apoptosis in human neuroblastoma cells // *J. Nutr. Biochem.*—2000.—11.—P. 208—215.
 10. Ostrovskiy Yu. M. On the mechanism of coenzymic and noncoenzymic action of thiamine // *J. Vitaminol.*—1968.—14 (suppl.).—P. 98—102.
 11. Пархоменко Ю. М., Донченко Г. В., Протасова З. С. Нейроактивность тиамин: факты и гипотезы // *Укр. биохим. журн.*—1996.—62, № 2.—С. 3—15.
 12. Пархоменко Ю. М., Черныш Н. Ю., Чурилова Т. Я., Халмурадов А. Г. Влияние тиаминфосфатов на активность регуляторных ферментов пируватдегидрогеназного комплекса // *Укр. биохим. журн.*—1987.—59, № 6.—С. 49—54.
 13. Nghiem Y. O., Bettendorff L., Changeux J. P. Specific phosphorylation of Torpedo 43K rapsyn by endogenous kinase(s) with thiamine triphosphate as the phosphate donor // *FASEB J.*—2000.—14.—P. 543—544.
 14. Meador K., Loring D., Nichols M., Zamrini E., Rivner M., Posas H., Thompson E., Moore E. Preliminary findings of high-dose thiamine in dementia of Alzheimer's type // *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.*—1993.—6.—P. 222—229.
 15. Heroux M., Raghavendra Rao V. L., Lavoie J., Richardson J. S., Butterworth R. F. Alterations of thiamine phosphorylation and of thiamine-dependent enzymes in Alzheimer's disease // *Metab. Brain Diseases.*—1996.—11.—P. 81—88.
 16. Butterworth R. F. Effects of thiamine deficiency on brain metabolism: implications for the pathogenesis of the Wernicke-Korsakoff syndrome // *Alcohol. Alcohol.*—1989.—24.—P. 271—279.
 17. Hazell A. S., Todd K. G., Butterworth R. F. Mechanisms of neuronal cell death in Wernicke's encephalopathy // *Metab. Brain Diseases.*—1998.—13.—P. 97—122.
 18. Tong W., Sun G. Y. Phosphorylation of lipids in rat primary glial cells and immortalized astrocytes (DITNC) // *Lipids.*—1994.—29.—P. 385—390.
 19. Rucker-Martin C., Henaff M., Hatem S. N., Delpy E., Mercadier J. J. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis of adult rat ventricular myocytes *in vitro* // *Basic Res. Cardiol.*—1999.—94.—P. 171—179.
 20. Godard T., Deslandes E., Lebailly P., Vigreux C., Sichel F., Poul J. M., Gauduchon P. Early detection of staurosporine-induced apoptosis by comet and annexin V assays // *Histochem. Cell Biol.*—1999.—112.—P. 155—161.
 21. Nagathihalli S. N., Nadarajah V., Wolfgang Z. Hypoxia-mediated apoptosis in oral carcinoma cells occurs via two independent pathways // *Mol. Cancer.*—2004.—3.—P. 1—14.
 22. Zhang G., Zhou G., Dai Ch. Upregulation and activation of caspase-3 or caspase-8 and elevation of intracellular free calcium mediated apoptosis of indomethacin-induced K562 cells // *China's Med. J.*—2004.—117.—P. 978—984.
 23. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.*—1976.—72.—P. 248—254.
 24. Островский Ю. М. Тиамин.—Минск, 1971.—144 с.

УДК 576.6 577.16

Надійшла до редакції 05.04.05