

Ю. М. ПАРХОМЕНКО¹, Г. В. ДОНЧЕНКО¹, С. А. ЧОРНЫЙ¹, О. Р. ЯНЧИЙ¹,
А. А. СТРОКИНА¹, С. П. СТЕПАНЕНКО¹, Л. И. ЧЕХОВСКАЯ¹,
С. Ю. ПИЛИПЧУК¹, Н. Х. ПОГОРЕЛАЯ²

ОБМЕН ТИАМИНА В НЕРВНЫХ КЛЕТКАХ И ИХ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭТАНОЛА И АЦЕТАЛЬДЕГИДА

Поступила 12.05.13

Изучали чувствительность реакций обмена тиамин в нервных клетках к этанолу и ацетальдегиду, а также влияния указанных соединений на жизнеспособность культивируемых клеток различного происхождения. Исследования проводили на клетках в культуре, препаратах изолированных нервных окончаний (синапсосомах), препаратах плазматических мембран синапсом (ПМС) и препаратах ферментов. Определены концентрационные характеристики (IC_{50}) действия этанола и ацетальдегида на реакции, принимающие участие в обмене подвижного пула тиамин в клетках. Этанол в физиологических концентрациях ингибировал тиаминсвязывающую активность ПМС ($IC_{50} = 3.9$ мМ). В то же время в указанных концентрациях он практически не влиял ни на тиаминфосфатгидролазную активность ПМС (оценивалась по тиаминтрифосфатазной активности), ни на активность тиаминпирофосфокиназы (ТПК). Продукт метаболизма этанола ацетальдегид ингибировал тиаминтрифосфатазную активность с $K_i = 6.2$ мкМ и активность ТПК с $K_i = 1.2$ мкМ. Показатели выживаемости культивируемых клеток определяли в условиях добавления этанола и ацетальдегида в среду. Клетки астроцитарного происхождения (линия 1321N1) и клетки крови (линия U937) практически не реагировали на присутствие в питательной среде этанола или ацетальдегида даже в весьма высоких концентрациях. Нейроноподобные (дифференцированные) культивируемые клетки линии РС-12, а также гранулярные нейроны мозжечка в условиях первичной культуры отвечали на добавление указанных веществ достоверным снижением индекса жизнеспособности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тиамин, тиаминтрифосфат, тиаминкиназа, этанол, ацетальдегид, нервные клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Витамин В₁ (тиамин), как и другие витамины, является необходимым фактором для поддержания жизнедеятельности человека и животных. Он не синтезируется в организме и поэтому должен постоянно поступать с пищей. Давно было отмечено, что нервные клетки особо чувствительны к дефициту тиамин [1]. Многолетние наблюдения свиде-

тельствуют о том, что функциональные нарушения тиаминзависимых процессов в организме человека представляют собой важный патогенетический/отягчающий фактор при таких заболеваниях, как сверхнекротизирующая энцефаломиелопатия (болезнь Лея) [1], синдром Вернике–Корсакова (частое заболевание при хроническом алкоголизме) [2], болезнь Альцгеймера [3], болезнь Паркинсона [4] и другие. В то же время ряд аспектов участия тиамин в фундаментальных биохимических процессах, обеспечивающих жизнедеятельность клеток (в том числе нервных), окончательно не выяснены.

На сегодняшний день достаточно хорошо изучена коферментная функция тиамин. Такое производное тиамин, как тиаминдифосфат (ТДФ), является коферментом ряда ферментов, вовлеченных в углеводный обмен. Нарушение функций этих фер-

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев (Украина).

²Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

Эл. почта: yupark@biochem.kiev.ua (Ю. М. Пархоменко);
dongv@biochem.kiev.ua (Г. В. Донченко);
sch_1982@yahoo.com (С. А. Чорный);
roksana75@gmail.com (О. Р. Янчий);
a_strokina@mail.ru (А. А. Строкина);
sst@biochem.kiev.ua (С. П. Степаненко);
Lilia.59@mail.ru (Л. И. Чеховская).

ментов может индуцировать процессы нейродегенерации [5]. Оказалось, однако, что далеко не всегда негативные функциональные изменения в нервных клетках можно интерпретировать, принимая во внимание лишь коферментную роль ТДФ. Так, в процессе исследования этиологии болезни Лея изменений в активности ТДФ-зависимых энзимов выявлено не было [6]. В то же время в ткани мозга наблюдалось ингибирование синтеза тиаминтрифосфата (ТТФ) – производного тиамин, в молекуле которого содержится макроэргическая связь при γ -фосфатной группе. Роль данного соединения в клетках, несмотря на некоторый прогресс в этом вопросе, окончательно не выяснена [7, 8]. Со временем накопились и иные наблюдения, свидетельствующие о том, что, помимо хорошо изученной «коферментной» роли, витамин В₁ выполняет в клетках и другие функции. Последние условно называли «некоферментными»; они также, очевидно, играют существенную роль в обеспечении жизнедеятельности нервных клеток [8, 9].

На основе анализа полученных данных была сформулирована гипотеза о существовании в возбудимых клетках подвижного пула тиамин и его фосфатов. При функционировании синаптических структур циркуляция этого пула между внутриклеточным пространством и синаптической щелью сопровождается фосфорилированием–дефосфорилированием тиамин, что сопряжено с изменениями мембранного потенциала клетки [1, 10, 11]. По нашим предположениям, в циркуляции компонентов подвижного пула тиамин (свободного тиамин и его фосфатов) принимают участие мембранный тиаминсвязывающий протеин плазматических мембран нервных клеток (он, согласно нашим данным, обладает способностью связывать тиамин и избирательно гидролизовать фосфорные эфиры тиамин [12–14]) и цитозольные энзимы, осуществляющие синтез и гидролиз тиаминфосфатов. Среди этих энзимов ключевым является тиаминкиназа (КФ 2.7.6.2), осуществляющая первый этап фосфорилирования поступившего в клетку тиамин – синтез ТДФ из свободного тиамин.

При проверке справедливости гипотезы о роли подвижного пула тиамин в поддержании жизнедеятельности возбудимых клеток актуальным является вопрос о взаимосвязи влияния различных патогенетических факторов на реакции обмена тиамин в нервных клетках и на их жизнеспособность. Одним из факторов, способствующих нарушению обмена тиамин в нервных клетках и развитию его дефицита, является

хроническое воздействие алкоголя (этанол). Именно хронический алкоголизм является наиболее распространенной причиной развития у взрослых болезни Вернике–Корсакова, которая связана с серьезными нарушениями метаболизма витамина В₁ [2, 15, 16]. Соответствующие патологические сдвиги сопоставимы с наблюдаемыми при алиментарной недостаточности витамина В₁ (болезни бери-бери). Многие исследователи считают, что развитие дефицита тиамин в организме хронических алкоголиков связано в первую очередь с неадекватным питанием этих людей и угнетением под действием алкоголя абсорбции данного витамина в желудочно-кишечном тракте и лишь потом – с нарушением обмена тиамин в клетках под влиянием этанола [15, 16]. Следует, однако, отметить, что если оценке статуса витамина В₁ в организме человека и животных при длительном потреблении алкоголя посвящено большое количество работ, то вопрос о прямых влияниях этанола и его токсичного метаболита (ацетальдегида) на отдельные реакции обмена тиамин практически не изучен. Очевидно, что соответствующие исследования имеет смысл проводить в экспериментах *in vitro* на изолированных клеточных структурах или препаратах энзимов.

С учетом всего вышесказанного в настоящей работе мы исследовали влияния этанола и ацетальдегида на ключевые реакции обмена подвижного пула тиамин в нервных клетках в условиях *in vitro*, а также на выживаемость клеток различного происхождения (в том числе нервных) в культуре.

МЕТОДИКА

В экспериментах использовали самцов беспородных белых крыс с массой тела 180–200 г; декапитацию животных производили под эфирным наркозом.

Получение препаратов синапсом и плазматических мембран синапсом (ПМС). Все операции по выделению синапсом и ПМС из мозга крыс проводили согласно ранее опубликованной методике [17] при температуре 0–4 °С; в буфер добавляли ингибитор протеаз ФМСФ (0.5–1.0 мМ). Необходимые фракции получали, используя дифференциальное центрифугирование в градиенте плотности сахарозы.

Частично очищенный препарат тиаминкиназы из мозга крыс получали также согласно описанной методике [18]. Тиаминсвязывающую активность пре-

паратов ПМС определяли с помощью радиолигандного метода [17] с использованием меченного по углероду [тиазол-2- ^{14}C] тиамин в Рингер-бикарбонатном буфере (0.05 М, рН 7.4). Объем инкубационной среды составлял 0.25 или 0.5 мл, концентрация [^{14}C]тиамина в пробе варьировала от 2 до 10 мкМ. Инкубацию проводили при 37 °С и при концентрации белка в пробе 0.5 мг/мл в течение 5 мин. Реакцию останавливали путем добавления в инкубационную среду охлажденного до 0 °С 0.1 %-ного раствора γ -глобулина G и 25 % полиэтиленгликоля для осаждения белка. Несвязавшийся лиганд отделяли, применяя фильтрацию под вакуумом на мембранных фильтрах Whatman GF/C с диаметром пор 0.45 мкм; остающийся на фильтрах препарат дважды промывали 5 мл охлажденной инкубационной смеси. Фильтры с препаратами высушивали в потоке воздуха и переносили во флаконы со сцинтилляционной жидкостью СЖ-1. Радиоактивность измеряли, используя жидкостный сцинтилляционный счетчик SL-20 («Intertechnique», Франция). Величину специфического связывания определяли по разнице между общим (инкубация только с меченым тиамин) и неспецифическим (инкубация в присутствии 100-кратного избытка немеченого тиамин) связыванием. Удельную активность выражали в наномолях тиамин, связавшегося с 1 мг белка в указанных условиях (удельная радиоактивность использованного препарата тиамин составляла 25.7 мКи/ммоль).

Активность ТТФазы определяли по образованию ТДФ при инкубации препаратов ПМС. Инкубационная смесь для определения ТТФ-азной активности содержала в себе 50 мМ трис-НСI-буфера (или 20 мМ ацетатного, малеатного или трис-малеатного буфера; рН 7.4), 10 мМ MgCl_2 и 10^{-4} М ТТФ; концентрация белка в пробе равнялась 0.5 мг/мл. Общий объем пробы составлял 0.5 мл. Реакцию проводили в течение 20 мин при 37 °С и останавливали путем добавления 2 мл Na-фосфатного буфера (0.05 М, рН 6.8). Для количественного определения образовавшегося ТДФ 0.1 мл аликвоты инкубировали с апопируватдекарбоксилазой (апоПДК) в течение 30 мин при 25 °С.

Ферментативное определение ТДФ основано на рекомбинации его как кофермента с апоПДК и проведении реакции с избытком пирувата в присутствии алкогольдегидрогеназы [18]. Активность рекомбинантной холоПДК определяли в алкогольдегидрогеназа-сопряженной реакции соответственно экстинкции НАДН при длине волны

340 нм. Количество образовавшегося ТДФ рассчитывали по калибровочной кривой, которую строили с использованием определенных концентраций хроматографически чистого ТДФ.

АпоПДК для определения ТДФ получали из пивных дрожжей (*Saccharomyces carlsbergensis*) в виде пасты по описанному методу [18]. До использования пасту хранили при -20 °С; непосредственно перед работой из нее получали апофермент, отделяя ТДФ на колонке с сефадексом Г-25 в присутствии ЭДТА.

Активность тиаминкиназы (ТК) измеряли с помощью описанной ранее методики [19]. Принцип последней заключается в определении количества ТДФ, образующегося при инкубации тиамин с препаратами ТК. Анализ количества синтезированного ТДФ проводился так же, как и в случае измерения ТТФазной активности.

В экспериментах *in vitro* с ПМС и частично очищенной ТК использовался этанол в концентрациях в диапазоне 0.01–0.04 % (2–8 мМ), а его метаболит ацетальдегид – 2–50 мкМ. В литературе концентрация этанола, как правило, дается в процентах; поэтому для обеспечения сопоставимости полученных результатов мы приводим и данные значения, и молярную концентрацию. Этанол и ацетальдегид добавляли непосредственно в среду инкубации. В экспериментах с клеточными культурами эти соединения использовали в более высоких концентрациях (этанол – 10–40, ацетальдегид – 2 мМ).

Культуры клеток, применяемые в работе. В исследовании были использованы линии клеток РС-12 и 1321N1, полученные из коллекции клеток АТСС (США), а также линия нейробластомы N1E115, полученная из Института физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины.

Линия клеток РС-12 (феохромоцитомы) – это опухоль (раковая) клетки ткани надпочечников крыс, способные к дифференциации в нейроноподобные и эндокринные клетки. Условия их культивирования были описаны нами ранее [20]. Дифференцировку клеток в нейроны осуществляли путем добавления 100 мкМ нейронного ростового фактора крысы (NGF, «Sigma», США) к клеточной среде и инкубации на протяжении трех дней. Линия клеток 1321N1 (астроцитомы) представляют собой злокачественно перерожденные глиальные клетки (астроциты) мозга человека, имеющие мутантный белок p53. Клетки культивировались в среде DMEM с добавлением 5 % FCS и антибиотиков (1 % стрептомицина и 1 % пенициллина), как было описано ранее [20]. Клетки ли-

нии U937 (клетки лимфомы) культивировали на среде RPMI-1640 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 80 мкг/мл гентамицина. Для проведения экспериментов клетки высевали в 96-луночные планшеты (около 10^5 клеток в лунку).

Для получения первичной культуры нейронов гранулярные клетки мозжечка (cerebellar granular neurons) изолировали из мозга крыс. Получение гранулярных нейронов из мозжечка включало в себя следующие основные операции. Крысят в возрасте один-два дня декапитировали, изымали мозг и выделяли мозжечок. Манипуляции проводились на ледяной подкладке. Ткань измельчали тонким скальпелем или ножницами, помещали в охлажденную среду и промывали. Добавляли 2 мл 0.4 %-ного раствора трипсина и инкубировали в течение 15 мин при 37 °С, после чего центрифугировали в течение 1 мин при 50g.

Осадок клеток суспендировали в приготовленной заранее среде, в которую добавляли 2 мл 100 %-ной сыворотки. Суспензию клеток промывали средой дважды и перемешивали. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева.

МТТ-тест. Уровень жизнеспособности клеток (относительное количество живых клеток) определяли с помощью реагента МТТ (диметилтиазолтрифенилтетразолия бромид) по стандартной методике [20]. После измерения уровня экстинкции ($l = 570$ нм) окрашенной МТТ суспензии клеток на планшетном сканере рассчитывали их относительное количество в образце.

Значения IC_{50} (концентрации эффектора, при которой ингибирование составляет 50 % максимального) определяли с использованием графика зависимости интенсивности ингибирования от концентрации исследуемого вещества [21]. Эффективность ингибирования вычисляли по формуле: $[(A_0 - A)/A_0] \cdot 100 \%$, где A_0 – активность в отсутствие, а A – активность в присутствии исследуемого эффектора. Величину ингибирования X , составляющую 50 % максимального, рассчитывали по формуле: $X = I_{max} - 0.5 \cdot (I_{max} - I_{min})$.

Числовые данные обрабатывали, применяя общепринятые методы статистики. Рассчитывали значения средних арифметических (M) и ошибок среднего (m). Для определения достоверности различий между средними величинами использовали t -критерий Стьюдента. Различия с $P < 0.05$ считали значимыми. Для расчетов и графического представления полученных результатов была использована компьютерная программа «Microsoft Excel».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что хроническое воздействие этанола на организм вызывает нарушение обмена тиамин в тканях [16, 17], в частности значительное снижение активности ключевого фермента в обмене тиамин – ТК – в ткани мозга. Мы пытались приблизиться к пониманию молекулярных механизмов действия этанола на обмен тиамин в нервных клетках, исследуя в данной работе в опытах *in vitro* влияния этанола и его метаболита ацетальдегида на отдельные реакции метаболизма тиамин, а также на жизнеспособность культивируемых нейронов, нейроноподобных и глиальных клеток, а также клеток крови.

Влияние этанола и ацетальдегида на метаболические реакции тиамин и его производных. Ранее в опытах *in vivo* было показано, что при длительном употреблении животными алкоголя активность протеинов, участвующих в обмене тиамин, уменьшается. В частности, снижаются способность связывать меченый тиамин тиаминсвязывающим белком (ТСБ) и активность ТК, а также активность пируватдегидрогеназного комплекса за счет фосфорилирования первого компонента последнего [22]. В целом мы расцениваем это как свидетельство замедления обмена подвижного пула тиамин в нервных клетках [2]. С целью ответить на вопрос, является ли упомянутый эффект результатом снижения концентрации производных данного витамина в организме или прямого действия этанола и/или его метаболита ацетальдегида на указанные протеины, мы провели опыты *in vitro* на изолированных препаратах плазматических мембран и частично очищенных препаратах ТК. Исследовали влияние упомянутых агентов на оба проявления активности ТСБ в составе ПМС [14]. В этой серии опытов были использованы те же методические подходы, что и в предыдущих исследованиях; эффект каждого соединения оценивался по величине IC_{50} .

Диапазон концентраций обоих эффекторов подбирали на основании данных литературы о возможном содержании этих агентов в крови людей, употребляющих этанол. Так, концентрация этанола была подобрана согласно сведениям о линейной зависимости между концентрацией этанола в крови и его содержанием в головном мозгу [23]. Выше (Методика) уже отмечалось, что при изложении результатов мы сочли целесообразным упоминать значения концентраций этанола и ацетальдегида как в процентах, так и в молях на 1 л. Согласно данным

литературы, концентрация эндогенного этанола в крови человека в норме составляет 0.004–0.01 % (0.87–2.2 мМ), а в состоянии легкого опьянения – 0.02–0.05 % (4.35–10.9 мМ) [23]. При концентрации этанола в крови 0.05 % его концентрация в мозгу составляет примерно 0.04 % (8.7 мМ) [23]. Данные о концентрации ацетальдегида в мозгу субъектов с хроническим алкоголизмом очень разноречивы. Максимальная концентрация ацетальдегида в мозгу после приема больших количеств алкоголя достигает 100 мкМ, но постоянная концентрация этого соединения значительно ниже и варьирует в пределах 6–7 мкМ [24].

Прежде всего мы исследовали с использованием меченого тиамина влияние этанола и ацетальдегида на способность ПМС специфически связывать тиамин. Согласно нашим представлениям о детерминированности транспорта свободного тиамина из внеклеточного пространства внутрь клетки [2], этот параметр отражает способность нервных клеток активно поглощать свободный тиамин из межклеточного пространства. Результаты данной серии экспериментов суммированы на рис. 1. Они свидетельствуют о том, что оба соединения достаточно эффективно угнетают способность ПМС связывать тиамин. Это должно определять и снижение способности плазматических мембран нервных клеток активно транспортировать тиамин. Рассчитанные графическим методом значения IC_{50} оказались равными 3.90 мМ для этанола и 6.2 мкМ для ацеталь-

дегида. Действие этанола на активность ТТФазы во фракции ПМС определяли в диапазоне концентраций 0.01–0.04 %, что соответствует молярной концентрации 2.2–8.7 мМ; этанол вносили непосредственно в среду инкубации при постоянной концентрации ТТФ (80 мкМ). Полученные результаты, представленные на рис. 2, А, свидетельствуют о том, что этанол не оказывает влияния на рассматриваемую активность. Эти данные подтверждают вывод, сделанный нами ранее, о том, что белковые сайты, ответственные за тиаминфосфатгидролазную активность, локализованы на внутренней поверхности плазматических мембран [15].

Исследуя влияние ацетальдегида на ТТФазную активность ПМС, мы вносили указанный агент непосредственно в среду инкубации в диапазоне концентраций 2–50 мкМ при постоянной концентрации ТТФ. Результаты, представленные на рис. 2, Б, свидетельствуют о том, что в изолированных мембранах в условиях инкубации их с ацетальдегидом в диапазоне возможных физиологических концентраций (2–20 мкМ) активность ТТФазы статистически достоверно ($P < 0.05$) возрастала. С дальнейшим увеличением концентрации ацетальдегида до 50 мкМ этот эффект уменьшался. Согласно данным литературы, пик концентрации ацетальдегида в мозгу через 10 мин после приема алкоголя составляет 6–7 мкМ и остается на таком уровне в течение достаточно длительного времени [24]. Вероятно, именно в таких дозах ацетальдегид в мозгу может

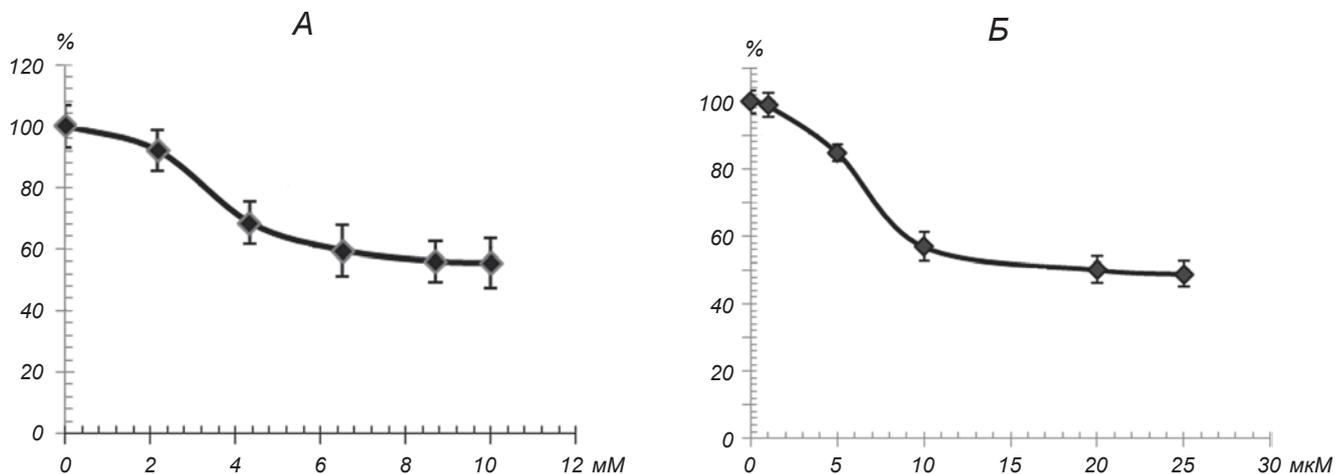
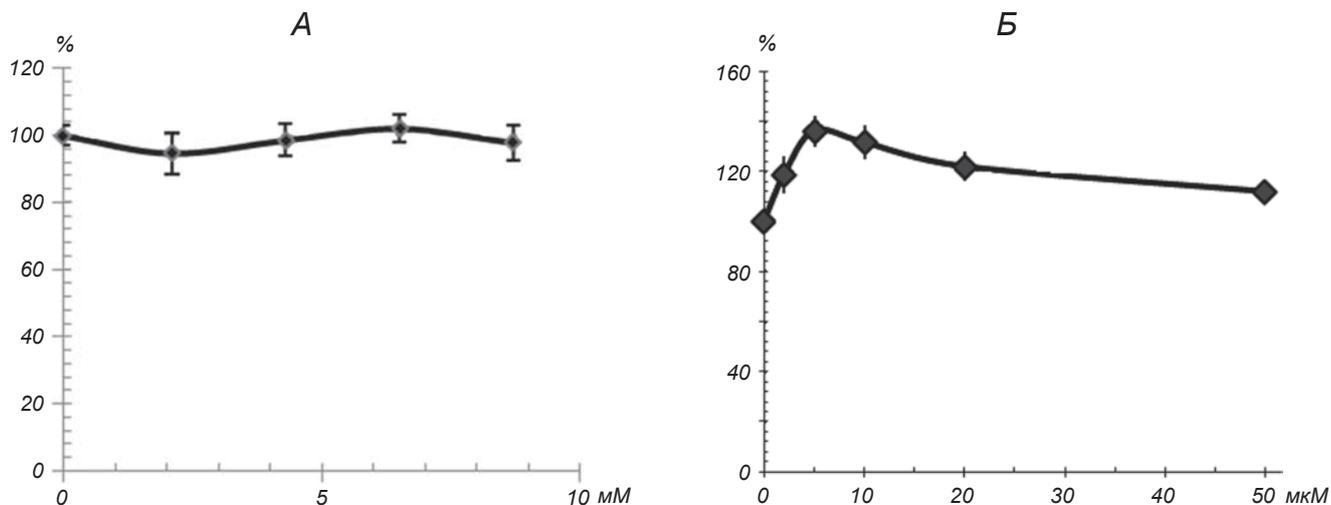


Рис. 1. Влияние этанола (А) и ацетальдегида (Б) на интенсивности связывания тиамина препаратами плазматических мембран синапсом.

По оси абсцисс – концентрация этанола, мМ (А) и ацетальдегида, мкМ (Б); по оси ординат – нормированная интенсивность связывания, % (за 100 % принята интенсивность связывания в отсутствие упомянутых агентов). Количество определений $n = 3$ во всех случаях.

Рис. 1. Вплив етанолу (А) та ацетальдегіду (Б) на інтенсивності зв'язування тіаміну препаратами плазматичних мембран синапсом.



Р и с. 2. Влияние этанола (А) и ацетальдегида (Б) на тиаминтрифосфатазную активность препаратов плазматических мембран синапсом.

По оси ординат – нормированная активность тиаминтрифосфатазы (ТТФ), % (за 100 % принята активность ТТФ в отсутствие эффектов). Концентрация ТТФ 80 мкМ. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Р и с. 2. Вплив етанолу (А) та ацетальдегіду (Б) на тіамінтрифосфатазну активність препаратів плазматичних мембран синапсом.

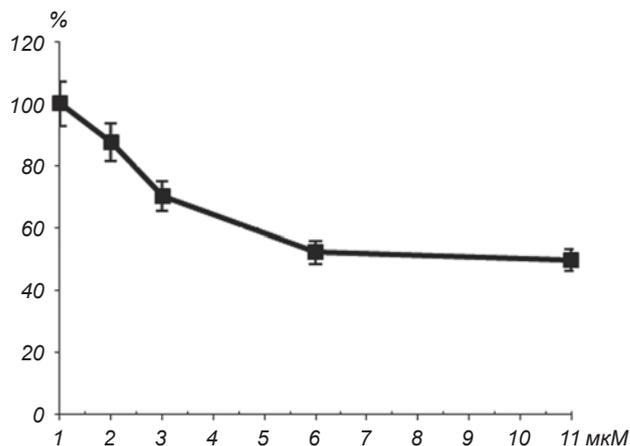
оказывать наиболее эффективное влияние на биохимические процессы. Наблюдаемое нами активирующее влияние ацетальдегида на реакцию гидролиза ТТФ (а следовательно, и всех тиаминфосфатов) в плазматических мембранах может быть причиной истощения пула тиамин в нервных клетках. При деполяризации возбудимых мембран наблюдаются гидролиз не связанных с протеинами тиаминфосфатов и выход из клетки свободного тиамин [2].

Используя этанол и ацетальдегид в вышеуказанных концентрациях в инкубационной среде, мы исследовали *in vitro* влияние этих соединений и на активность частично очищенных препаратов ТК. Результаты данных опытов показали, что этанол в физиологических концентрациях не влияет на активность ТК (не иллюстрируется), в то время как ацетальдегид существенно снижает упомянутый показатель (рис. 3). Определенное с применением графического метода [22] значение IC_{50} было равным 1.2 мкМ.

Обобщенные данные относительно действия этанола и ацетальдегида на активность исследованных ферментов с учетом возможных концентраций исследованных соединений в ткани мозга при хроническом потреблении алкоголя свидетельствуют о том, что в нервных клетках наиболее уязвимыми процессами к действию указанного агента являются поглощение тиамин этими клетками и фосфорилирование поглощенного тиамин, обеспечиваемое действием ТК.

Влияние этанола и ацетальдегида на жизнеспособность клеток в культуре (тест с МТТ).

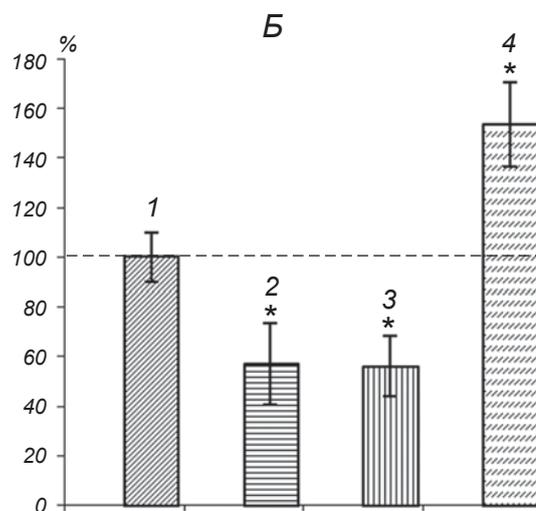
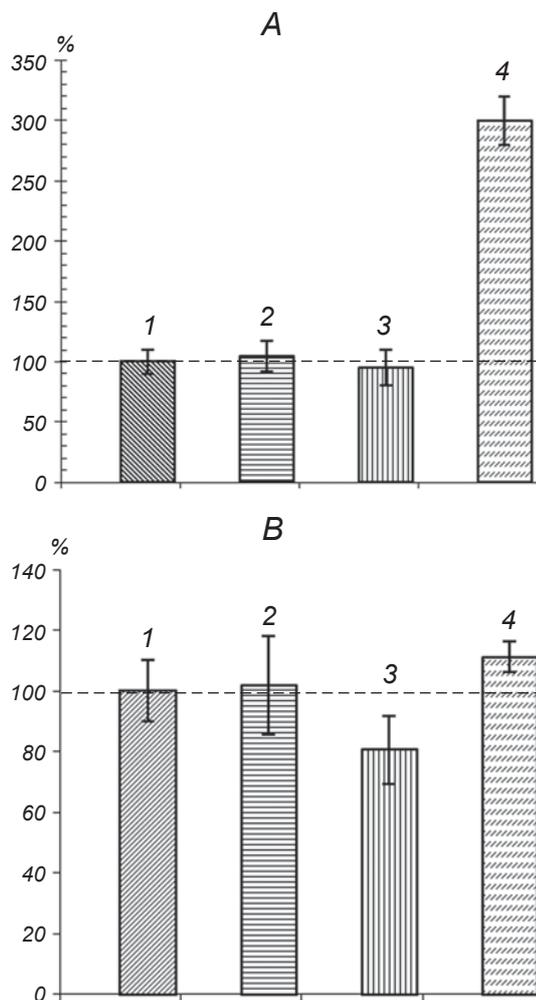
Как уже указывалось ранее, длительное потребление алкоголя может стать причиной развития болезни Вернике–Корсакова, по симптоматике напоминающей болезнь бери-бери (классический алиментарный V_1 -авитаминоз); обычно такое потребление сопровождается дефицитом тиамин [16]. И в том, и в другом случае наблюдаемые симптомы заболеваний обусловлены прежде всего нарушением функций нервных клеток (развитием полиневрита). С целью проверить, действительно ли клетки нервной ткани



Р и с. 3. Влияние ацетальдегида на активность тиаминкиназы (ТК).

По оси ординат – нормированная активность ТК, % (за 100 % принята активность ТК в отсутствие агента). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1, Б.

Р и с. 3. Вплив ацетальдегіду на активність тіамінкінази.



Р и с. 4. Влияния этанола, ацетальдегида и тиамина на жизнеспособность культивируемых клеток линий 1321N1 (А), РС-12 (Б) и U937 (В), по данным МТТ-теста.

По вертикали – индекс жизнеспособности, %. Длительность культивирования три дня. 1 – контроль (принят за 100 %), 2–4 – в условиях добавления в среду 10 мМ этанола (2), 2 мМ ацетальдегида (3) и 0.5 мМ тиамина (4).

Р и с. 4. Впливи етанолу, ацетальдегіду і тіаміну на життєздатність культивованих клітин ліній 1321N1 (А), РС-12 (Б) і U937 (В), за даними МТТ-тесту.

отличаются от клеток других тканей высокой чувствительностью к факторам, нарушающим обмен тиамин, мы исследовали влияние этанола и ацетальдегида на жизнеспособность культивируемых клеток различного происхождения. Учитывая полученные ранее данные о различной чувствительности к антагонистам тиамин нейроноподобных клеток и астроцитов [21], в настоящем исследовании мы использовали клетки линии РС-12, дифференцированные в нейроноподобные единицы, и клетки астроцитарного происхождения линии 1321N1. Для сравнения исследовали злокачественно перерожденные клетки крови человека (линия U937). Было проведено также исследование влияния этанола и ацетальдегида на гранулярные нейроны в условиях первичной культуры клеток мозжечка.

Данные, приведенные на рис. 4, подтверждают ранее сделанные выводы о более высокой чувствительности нейроноподобных дифференцированных клеток к факторам, которые влияют на обмен тиамин. Действительно, клетки астроцитарного про-

исхождения не реагировали (или почти не реагировали) на присутствие в питательной среде этанола и ацетальдегида даже в довольно высоких концентрациях (А). В то же время дифференцированные клетки линии РС-12 в тех же условиях отвечали на присутствие этих веществ достоверным снижением количества жизнеспособных единиц почти вдвое (Б). На показатель жизнеспособности клеток крови линии U937 этанол (и, что интересно, тиамин) в использованных концентрациях вообще не оказывали достоверного влияния (В). Действие ацетальдегида в этом случае было слабо выражено, и, вероятно, эффект не был связан с нарушением обмена тиамин. Культивируемые гранулярные клетки мозжечка реагировали на присутствие в среде этанола подобно дифференцированным клеткам РС-12 (рис. 5).

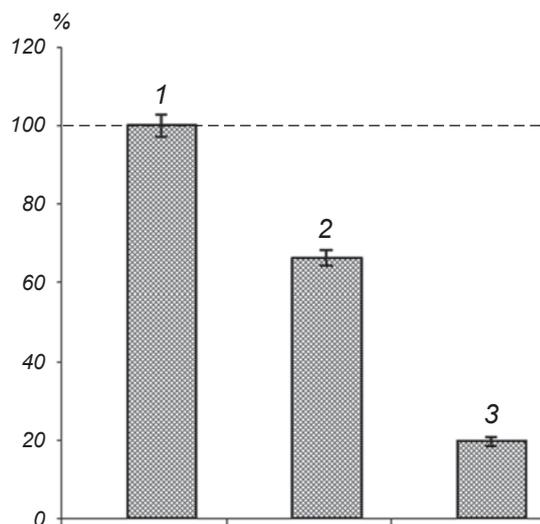
Привлекает внимание реакция исследуемых клеток на добавление в инкубационную среду тиамин в концентрации 0.5 мМ. Клетки линии U937 почти не реагировали на эту добавку, в то время как нейроноподобные и глиальные клетки демонстрировали увеличение индекса жизнеспособности (особенно клетки линии 1321N1, близкие к раковым клеткам). Показатель жизнеспособности у клеток последней линии увеличивался в три раза, в то время как у клеток РС-12 – в полтора. С учетом этих

результатов возникает вопрос о допустимости использования тиамин в высоких дозах при лечении онкобольных.

Воздействие этанола на гранулярные нейроны мозжечка. Влияние этанола на первичную культуру было исследовано на гранулярных клетках мозжечка. Согласно имеющимся наблюдениям, именно мозжечок отвечает за те функции нервной системы, которые в первую очередь нарушаются при дефиците тиамин, индуцирующем развитие болезни бери-бери.

В этой серии опытов этанол использовали в концентрациях 0.05 % (10 мМ) и 0.2 % (40 мМ). Его вносили в среду трехдневной культуры клеток, после чего клетки инкубировались 24 ч. Гранулярные нейроны мозжечка оказались очень чувствительными к действию этанола. При инкубации их с 0.05 % (10 мМ) этанола погибало около 35 % клеток, а при добавлении 0.2 % (40 мМ) – более 75 % (рис. 5). Иными словами, действие этанола на первичную культуру нейронов имело такой же характер, как и его действие на дифференцированные нейроноподобные клетки РС12 в культуре.

Анализируя результаты, полученные нами в экспериментах *in vitro* в целом, можно заключить, что хроническое употребление алкоголя должно приводить к замедлению обмена подвижного пула тиамин



Р и с. 5. Влияние этанола (2 – 10, 3 – 40 мМ) на индекс жизнеспособности культивируемых гранулярных нейронов мозжечка, % (за 100 % принят индекс в отсутствие этанола (1) – контроль).

Р и с. 5. Вплив етанолу (2 – 10, 3 – 40 мМ) на індекс життєздатності культивованих гранулярних нейронів мозочка, % (за 100 % прийнято індекс за відсутності етанолу (1) – контроль).

на в нервних клетках вследствие прямого ингибирующего влияния этанола на поглощение тиамин этими клетками (снижения способности плазматических мембран специфически связывать тиамин), а также эффективного ингибирования ацетальдегидом фосфорилирования тиамин в клетке, обеспечиваемого активностью ТК.

Наши данные, полученные в экспериментах с клетками различного происхождения, подтверждают особо высокую чувствительность возбудимых клеток к нарушениям обмена тиамин. Так, клетки астроцитарного происхождения (линии 1321N1) и клетки крови (линии U937) почти не реагировали на присутствие в питательной среде этанола и ацетальдегида даже в довольно высоких концентрациях. В то же время дифференцированные (нейроноподобные) клетки линии РС-12 в тех же условиях отвечали на наличие этих веществ достоверным снижением показателя жизнеспособности почти вдвое. Высокую чувствительность к негативному воздействию этанола продемонстрировали и нейроны мозжечка в условиях первичной культуры.

Исследования были проведены в соответствии с положениями Международной конвенции по защите животных, которые используются в экспериментах и других научных целях (Страсбург, 1985), а также согласно положениям Комитетов по биоэтике Института биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины и Института физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины.

Авторы представленной работы – Ю. М. Пархоменко, Г. В. Донченко, С. А. Чорный, О. Р. Янчий, А. О. Строкина, С. П. Степаненко, Л. И. Чеховская, С. Ю. Пилипчук и Н. Х. Погорелая – подтверждают, что у них отсутствует конфликт интересов.

Ю. М. Пархоменко¹, Г. В. Донченко¹, С. А. Чорный¹, О. Р. Янчий¹, А. О. Строкина¹, С. П. Степаненко¹, Л. И. Чехівська¹, С. Ю. Пилипчук¹, Н. Х. Погоріла²

ОБМІН ТІАМІНУ В НЕРВОВИХ КЛІТИНАХ ТА ЇХ ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ПРИ ДІЇ ЕТАНОЛУ ТА АЦЕТАЛЬДЕГІДУ

¹ Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ (Україна).

² Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

Резюме

Вивчали чутливість реакцій обміну тіаміну в нервних клітинах до дії етанолу та ацетальдегіду, а також впливи вка-

заних сполук на життєздатність культивованих клітин різного походження. Дослідження проводили на клітинах у культурі, препаратах ізольованих нервових закінчень (синаптосомах), препаратах плазматичних мембран синаптосом (ПМС) і препаратах ферментів. Були визначені концентраційні характеристики (IC_{50}) дії етанолу та ацетальдегіду на реакції, що беруть участь в обміні рухомого пулу тіаміну в клітинах. Етанол у фізіологічних концентраціях інгібував тіамінз'язуючу активність ПМС ($IC_{50} = 3.9$ мМ). У той же час він практично не впливав у вказаних концентраціях ані на тіамінфосфатгідролазну активність ПМС (оцінювалася за тіамінтрифосфатазною активністю), ані на активність тіамінпірофосфокінази (ТПК). Продукт метаболізму етанолу ацетальдегід інгібував тіамінтрифосфатазну активність із $K_i = 6.2$ мкМ та активність ТПК із $K_i = 1.2$ мкМ. Показники виживаності культивованих клітин визначали в умовах додання етанолу та ацетальдегіду в середовище. Клітини астроцитарного походження (лінія 1321N1) і клітини крові (лінія U937) практично не реагували на присутність у живильному середовищі етанолу або ацетальдегіду навіть у вельми високих концентраціях. Нейроноподібні (диференційовані) культивовані клітини лінії РС-12, а також гранулярні нейрони мозочка в умовах первинної культури відповідали на додання вказаних речовин вірогідним зниженням індексу життєздатності.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ю. М. Пархоменко, З. С. Протасова, Г. В. Донченко, "Нейроактивность тиамина: факты и гипотезы", *Укр. биохим. журн.*, **68**, № 2, 3-15 (1996).
2. A. Bâ, "Comparative effects of alcohol and thiamine deficiency on the developing central nervous system," *Behav. Brain Res.*, **225**, 235-242 (2011).
3. M. Heroux, V. L. Raghavendra Rao, J. Lavoie, et al., "Alterations of thiamine phosphorylation and of thiamine-dependent enzymes in Alzheimer's disease," *Metab. Brain Dis.*, **11**, No. 1, 81-88 (1996).
4. K. V. Lu'o'ng and L. T. Nguyen, "Thiamine and Parkinson's disease," *J. Neurol. Sci.*, **316**, 1-8 (2012).
5. A. Bâ, "Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues," *Cell. Mol. Neurobiol.*, **28**, No. 7, 923-931 (2008).
6. J. H. Pincus, Y. Itokawa, and I. R. Cooper, "Enzyme inhibiting factor in subacute necrotizing encephalomyelopathy," *Neurology*, **19**, No. 6, 841-845 (1969).
7. H. O. Nghiem, L. Bettendorff, and J. P. Changeux, "Specific phosphorylation of Torpedo 43K rapsyn by endogenous kinase(s) with thiamine triphosphate as the phosphate donor," *FASEB J.*, **14**, No. 3, 543-554 (2000).
8. L. Bettendorff, "A non-cofactor role of thiamine derivatives in excitable cells?" *Arch. Physiol. Biochem.*, **104**, No. 6, 745-751 (1996).
9. Y. M. Ostrovskiy, "On the mechanism of coenzymic and noncoenzymic action of thiamine," *Vitaminology*, **14**, 98-102 (1968).
10. B. Berman and R. A. Fishman, "Thiamine phosphate metabolism and possible coenzyme independent function of thiamine in brain," *J. Neurochem.*, **24**, No. 3, 457-465 (1975).
11. L. Bettendorff and P. Wins, "Thiamin diphosphate in biological chemistry: new aspects of thiamin metabolism, especially triphosphate derivatives acting other than as cofactors," *FEBS J.*, **276**, No. 11, 2917-2925 (2009).
12. А. А. Сидорова (Строкина), С. П. Степаненко, Ю. М. Пархоменко, "Характеристика тиаминтрифосфатазы, ассоциированной с плазматическими мембранами нервных клеток", *Укр. биохим. журн.*, **81**, № 3, 57-65 (2009).
13. В. А. Постоевко, Ю. М. Пархоменко, А. И. Вовк и др., "Выделение и некоторые свойства тиаминасвязывающего белка синапсом головного мозга крыс", *Биохимия*, **52**, № 11, 1792-1797 (1987).
14. Ю. М. Пархоменко, А. А. Строкина, С. Ю. Пилипчук и др., "Наличие двух различных активных центров на тиаминасвязывающем протеине плазматических мембран синапсом", *Укр. биохим. журн.*, **82**, № 1, 34-41 (2010).
15. K. Chopra and V. Tiwari, "Alcoholic neuropathy: possible mechanisms and future treatment possibilities," *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **73**, No. 3, 348-362 (2012).
16. E. Rees and L. R. Gowing, "Supplementary thiamine is still important in Alcohol dependence," *Alcohol and Alcoholism*, **48**, No. 1, 88-92 (2013).
17. Ю. М. Пархоменко, З. С. Протасова, О. Р. Янчий и др., "Локализация тиаминасвязывающего белка в синаптосомах из головного мозга крыс", *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **33**, № 5, 161-165 (2001).
18. Ю. М. Островский, "Тиамин", в кн.: *Экспериментальная витаминология*, под ред. Ю. М. Островского, Наука и техника, Минск (1979), с. 176-223.
19. С. Ю. Пилипчук, Ю. М. Пархоменко, З. С. Протасова та ін., "Взаємодія тіамінкінази мозку щурів з тіаміном і його похідними", *Укр. биохим. журн.*, **73**, № 2, 51-57 (2001).
20. S. A. Chornyuy and Y. M. Parkhomenko, "Comparative characteristic of action of thiamine antagonists as apoptosis inducers in different types of nerve cells," *Укр. биохим. журн.*, **80**, № 5, 76-84 (2008).
21. В. К. Кибирев, Т. В. Осадчук, О. Б. Вадзюк и др., "Исследование производных 5-амино-4-ациламино-1H-пиразола в качестве ингибиторов фурина", *Укр. біохім. журн.*, **83**, № 1, 30-37 (2011).
22. Y. M. Parkhomenko, P. A. Kudryavtsev, S. Y. Pylypchuk, et al., "Chronic alcoholism in rats induces a compensatory response preserving brain thiamine diphosphate, but the brain 2-oxo acid dehydrogenases are inactivated despite unchanged coenzyme levels," *J. Neurochem.*, **117**, No. 6, 1055-1065 (2011).
23. *The Pharmacology of Alcohol and Alcohol Dependence*, H. Begleiter and B. Kissin (eds.), Oxford Univ. Press, New York (1996).
24. K. N. Boyd, T. K. O'Buckley, and A. L. Morrow, "Role of acetaldehyde in ethanol-induced elevation of the neuroactive steroid 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnan-20-one in rats," *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **32**, 1774-1781 (2008).