

А. С. ПАВЛОВА¹, С. П. СТЕПАНЕНКО¹, Л. И. ЧЕХОВСКАЯ¹,
А. А. ТИХОМИРОВ¹, Ю. М. ПАРХОМЕНКО¹

ЗАВИСИМОСТЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕТАБОЛИЗМА ВИТАМИНА В₁ И СОСТОЯНИЯ АСТРОГЛИИ В МОЗГУ КРЫС ОТ ПОСТУПЛЕНИЯ ДАННОГО ВИТАМИНА В ОРГАНИЗМ

Поступила 04.07.15

Воспроизведена модель гиповитаминоза В₁ на крысах, которые на протяжении шести недель ежедневно получали в рационе лишь около 20 % необходимого количества тиамин. В этих условиях общее содержание витамина В₁ (тиамина) в печени составляло в среднем 18,3 % контрольных значений, а содержание тиаминдифосфата (ТДФ) в крови и тканях мозга – 40 %. Общие показатели окислительно-восстановительного баланса (уровни реактивных форм кислорода – РФК – и свободных SH-групп) также были снижены. Активность тиаминпирофосфокиназы (ТРК) в цельном гомогенате мозга животных с дефицитом тиамин (ДТ) оказалась на 35 % выше, чем в контроле. В трех отделах мозга (коре, мозжечке и гиппокампе) измерены содержания протеинов, принимающих участие в обмене тиамин, – транспортера тиамин (ТНТР) и ТРК. При ДТ выявлена различная направленность изменений показателей для двух упомянутых протеинов: содержание ТРК во всех отделах мозга повышалось, в то время как содержание ТНТР в мозжечке и гиппокампе снижалось. После однократного введения 2,0 мг/кг тиамин животным с ДТ за сутки до конца эксперимента содержание ТРК во всех отделах мозга повышалось. В отношении ТНТР такой эффект наблюдался только в коре; в мозжечке и гиппокампе реакция на введение тиамин не была ярко выраженной. Одновременно во всех отделах мозга определяли содержание глиального фибриллярного кислого протеина (GFAP) – маркера астроцитов. Этот показатель при ДТ был стабильно сниженным во всех отделах мозга, но приближался к контрольному уровню после однократного введения тиамин. Обсуждается возможная связь изменений содержания ключевых протеинов, участвующих в обмене тиамин, с обеспеченностью организма данным витамином.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тиамин (витамин В₁), гиповитаминоз В₁, дефицит тиамин (ДТ), тиаминпирофосфокиназа (ТРК), транспортер тиамин (ТНТР-1), глиальный фибриллярный кислый протеин (GFAP).

ВВЕДЕНИЕ

Накопленные к настоящему времени данные убедительно свидетельствуют о том, что многие известные нейродегенеративные патологии, такие как бери-бери, синдром Вернике–Корсакова, некротизирующая энцефаломиелопатия (болезнь Лея), болезни Альцгеймера и Паркинсона, тиамин-зависимая анемия, метаболические болезни, вызванные дефицитом протеинов пируватдегидрогеназного комплекса и другие [1, 2], сопровождаются дефицитом тиамин (ДТ), выраженным в той или

иной степени. Это дает веские основания полагать, что иницирующим фактором для развития некоторых из указанных патологий могут оказаться ДТ и/или нарушения обмена упомянутого витамина. Именно поэтому исследователи все чаще используют экспериментальные модели ДТ для изучения механизмов развития ряда нейродегенеративных процессов [3–5]. Следует отметить, что в настоящее время в цивилизованном мире «классический» В₁-авитаминоз почти не встречается, однако соответствующий гиповитаминоз представляет собой достаточно распространенное явление. Очевидно, что в условиях данного гиповитаминоза страдают прежде всего нервные клетки. ДТ на ранних этапах проявляется неспецифично, в виде генера-

¹ Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев (Украина).
Эл. почта: aspavlova92@gmail.com (А. С. Павлова).

лизованных симптомов, таких как головная боль, усталость, раздражительность, расстройства деятельности кишечника и др. [6]. Глубокий ДТ приводит к развитию болезни бери-бери, которая без лечения часто заканчивается летально. Хотя в последнее время эта болезнь в чистом виде встречается редко [7], алиментарный В₁-гиповитаминоз (хроническое недостаточное поступление витамина с пищей) – явление, достаточно широко распространенное не только среди населения слабо-развитых стран, но и в современных мегаполисах. Причиной развития указанного состояния могут быть нерегулярное и несбалансированное питание, стрессы, наркотическая и алкогольная зависимости, действие негативных экологических факторов и некоторые хронические заболевания [8, 9]. Поскольку хронический ДТ может, как уже упоминалось инициировать развитие нейродегенеративных заболеваний, важно выяснить, как это состояние сказывается на процессах, обеспечивающих обмен тиамин в нервных клетках, прежде всего на синтезе биологически активной формы данного витамина – тиаминдифосфата (TDP), и как быстро можно восстановить нормальные характеристики указанных процессов путем введения витамина.

Витамин В₁ поступает в клетки в виде свободного тиамин; перенос осуществляется с участием протеина – транспортера тиамин (THTR) [11]. Тиамин немедленно фосфорилируется с образованием TDP; реакция катализируется тиаминпирофосфатазой (ТПК) – энзимом, переносящим пирофосфатную группировку с АТФ на тиамин [12]. Кроме вышеуказанных ферментов в плазматической мембране и цитоплазме клеток присутствуют гидролазы, ответственные за деградацию фосфорных эфиров тиамин. В итоге при возбуждении свободный тиамин выходит из нервных клеток в межклеточное пространство [13]. Очевидно, однако, что ключевыми протеинами, задействованными в обмен тиамин и обеспечивающими его регуляторное действие на метаболические процессы и функционирование возбудимых мембран в нервных клетках, можно считать ТПК и THTR [12].

Следует отметить, что, хотя биохимические механизмы участия тиамин в клеточном метаболизме и функционировании нервных клеток исследуются уже, практически на протяжении столетия, многие аспекты последствий хронического ДТ для его обмена и вообще для клеточного метаболизма в целом остаются недостаточно ясными. С учетом вышесказанного мы в условиях экспериментального гипови-

таминоза В₁ определяли изменения уровней ключевых протеинов обмена тиамин (ТПК и THTR), их ферментативной активности, содержание коферментной формы витамина (TDP), а также общие показатели метаболических процессов в нервных клетках, в частности окислительно-восстановительный баланс. Кроме того, учитывая существенную роль астроцитов в обеспечении функционирования нервных клеток (в частности, в условиях ДТ [14–16]), мы оценивали уровень маркерного белка астроцитов – глиального фибриллярного кислого протеина (GFAP). С целью выяснить, в какой степени изменения исследуемых показателей зависят от уровня тиамин в организме и возможна ли нормализация исследуемых параметров путем резкого усиления поступления витамина в клетки, отдельной группе крыс с экспериментальным В₁-гиповитаминозом за сутки до декапитации мы вводили тиамин в малой и высокой дозах 0.1 и 2.0 мг/кг массы тела.

МЕТОДИКА

В экспериментах были использованы молодые крысы линии Вистар, самцы с исходной массой тела 75–85 г. Животные были разделены на две группы – группу животных с ДТ, содержащихся на тиаминнедостаточной диете (с гиповитаминозом В₁), и группу контроля (К). Крысам группы ДТ выдавали тиаминдефицитный корм в том же количестве, в котором его потребляли крысы группы К. Крысы последней группы ежедневно получали тиамин в физиологически адекватных дозах. Животных обеих групп взвешивали два раза в неделю; эксперимент продолжался шесть недель. Было проведено два параллельных ряда экспериментов, в каждом из которых животные были разделены на три группы: контрольную группу (К), группу с гиповитаминозом (ДТ) и группу с коррекцией гиповитаминоза введением тиамин (ДТ + В₁). Половине крыс третьей группы однократно за сутки до окончания опытов вводили тиамин в дозе 0.1 мг/кг массы тела, а для другой половины доза была увеличена до 2.0 мг/кг.

При составлении диеты за основу была взята пропись Баи и соавт. [17]. К кормовой смеси был добавлен тиамин в дозе 160 мкг/кг; с учетом суточного потребления корма крысами в наших условиях (около 15–20 г) это соответствовало 15–20 % их суточной потребности в данном витамине [18]. Таким образом, использованная нами диета позволяла

получить экспериментальную модель не полного авитаминоза, а гиповитаминоза В₁. Такая модель, видимо достаточно близко воспроизводит весьма распространенное состояние у людей при ограниченном или несбалансированном питании. Состав диеты был следующим: сахара — 68.7 %, казеин — 22 %, солевая смесь — 4.5 %, хлопковое масло — 5 %, витаминная смесь — 0.22 %, холина хлорид — 0.4 %. В солевую смесь входили: CaCO₃ — 33 %, K₂HPO₄ — 35.82 %, Ca(H₂PO₄)₂·H₂O — 11.3 %, NaCl — 18.6 %, Fe(C₆H₅O₇)·6H₂O — 3.05 %, KI — 0.09 %, MnSO₄·H₂O — 0.42 %, ZnCl₂ — 0.03 %, CuSO₄·5H₂O — 0.03 %. Витаминная смесь содержала в себе инозитол — 88 %, пара-аминобензойную кислоту — 4 %, кальция пантотенат — 2.6 %, никотиновую кислоту — 1.7 %, пиридоксин — 0.26 %, рибофлавин — 0.5 %, биотин — 0.001 %, фолиевую кислоту — 0.02 %, 2-метил-1,4-нафтохинон — 0.17 %, ретинолаацетат — 0.9 % и эргокальциферол — 0.06 %.

Как упоминалось выше, на такой диете животные содержались в течение шести недель. После этого крыс декапитировали, головной мозг немедленно извлекали и помещали на лед. Для проведения иммуноблотинга отбирали навески ткани по 100 мг из трех отделов мозга — коры больших полушарий, мозжечка и гиппокампа. Навески гомогенизировали в трис-НСI-буфере (50 мМ; pH 8.0), к которому дополнительно добавляли 150 мМ NaCl, 1 % Triton X-100, 0.5 % дезоксихолата Na, 0.1 % SDS и коктейль ингибиторов протеаз. Соотношение ткань/буфер составляло 1:10. Остальные ткани мозга гомогенизировали в растворе трис-НСI (50 мМ), содержащем в себе 0.32 М сахаразы с добавлением PMSF (pH 7.4); полученные образцы использовали далее для определения указанных ниже биохимических параметров. Гомогенаты центрифугировали (16 000g) при охлаждении.

Активность ТРК определяли с использованием метода, описанного ранее [19]. Принцип определения заключался в измерении количества образованного TDP после инкубации тиаминa с ТРК-содержащим препаратом (в нашем случае — с гомогенатами ткани).

В образцах крови и гомогената мозга содержание TDP определяли с помощью разработанного ранее экспресс-метода с использованием апофермента дрожжевой апопируватдекарбоксилазы (апоПДК) [20]. Аликвоты гомогенатов мозга или проб (после инкубации с тиамином в случае определения активности ТРК) инкубировали в фосфатном буфере с добавлением апофермента в течение 30 мин. Энзиматическое определение TDP основано на ре-

комбинации последнего как кофермента с апоПДК и проведении реакции с избытком пирувата в присутствии алкогольдегидрогеназы. Реакция регистрировалась соответственно окислению NAD·H₂. Апопируватдекарбоксилазу для определения TDP получали из пивных дрожжей (*Saccharomyces carlsbergensis*) и использовали в виде сульфатной пасты [20], которую хранили при -20 °С; апофермент получали из пасты непосредственно перед экспериментом. Количество образовавшегося TDP рассчитывали по калибровочной кривой, которая строилась с применением стандартного реактива TDP.

Для определения содержания уровня тиаминa в печени крыс ткань печени гомогенизировали, тиамин и его фосфаты экстрагировали путем кипячения в кислой среде. Для гидролиза фосфорных эфиров тиаминa пробы инкубировали в течение 18 ч с кислой фосфатазой (pH_{онт} 4.5), после чего осадок отделяли, используя центрифугирование. Супернатант наносили на ионообменную смолу IRC-50; после промывания тиамин элюировали с помощью HCl (0.1 М). Определение тиаминa в элюатах с колонки проводили с применением известного титриметрического метода [21].

Внутриклеточный уровень реактивных форм кислорода (РФК) определяли с помощью специфического молекулярного реагента 2',7'-дихлорфлуоресцина диацетата (H₂DCF-DA; «Sigma», США) [20]. Интенсивность флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре при длине волн возбуждения и эмиссии 497 и 525 нм соответственно (ширина щели 2.5–5.0 нм). Измерения выполнялись при комнатной температуре (21–23 °С).

Протеины разделяли по их молекулярной массе с использованием электрофореза в 10 %-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в условиях денатурации с 0.1 % додецилсульфата натрия (SDS) по методу Леммли [22]. Разделение проводили в камере для вертикального электрофореза TV100Y («SciePlus», Великобритания).

Образцы для электрофореза перед нанесением на гель разводили четырехкратным буфером для образцов, который содержал в себе 125 мМ трис-НСI (pH 6.8), 20 % глицерина, 10 % SDS, 0.2 М дитиотреитола и 0.1 % бромфенолового синего, и нагревали в течение 5 мин при 95 °С. Образцы наносили из расчета 100 мкг протеина на трек. Вхождение протеина в гель происходило при 80 В, разделение в ПААГ — при 100 В. В качестве электродного буфера использовали раствор следующего состава: 25 мМ трис-НСI (pH 8.3), 195 мМ глицина и 0.1 % SDS.

Для электропереноса протеинов применяли нитроцеллюлозную мембрану. Электроперенос осуществляли при напряжении 100 В в течение 2 ч в буфере, который содержал в себе 10 мМ NaHCO₃, 3 мМ Na₂CO₃ и 20 % этанола. Сайты неспецифической сорбции на мембране блокировали в течение 2 ч фосфатным буфером (PBS) с добавлением 0.1 % Tween 20 (PBST; «Sigma», США). Далее мембрану промывали PBST, инкубировали с соответствующими первичными антителами (моноклональными anti-TPK1; «Abcam», США, поликлональными anti-TNTR1; «Sigma», США) и поликлональными anti-GFAP; «Santa Cruz Biotech», США) в течение 16 ч при +4 °С. Неспецифически связавшиеся антитела удаляли, промывая образцы в PBST (пять раз по 3 мин), после чего инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (anti-rabbit, № 9169; «Sigma», США). После отмывания иммунореактивные зоны визуализировали с помощью набора ECI; результат фиксировали на рентгеновской пленке. Блотограммы GFAP проявляли с использованием системы диаминобензидин + H₂O₂.

Концентрацию SH-групп определяли с применением реактива Элмана согласно описанному ранее методу [20].

Содержание белка определяли по методу Лоури и спектрофотометрически при 280 нм [20].

Числовые данные обрабатывали с применением критерия *t* Стьюдента. Рассчитывали средние арифметические (M) и среднеквадратические отклонения (s.d.). Межгрупповые различия считали достоверными при *P* < 0.05. Для расчетов и графической презентации полученных результатов были использованы программные средства «MS Office Excel 2007» и «Origin Pro 8.6».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изменения массы тела животных. Результаты взвешивания показали, что у крыс ДТ-группы на третьей неделе периода наблюдения масса тела переставала увеличиваться, а на 18–21-й день она начинала существенно снижаться. В то же время масса тела животных группы К возрастала стабильно. На момент окончания эксперимента (шесть недель) средняя масса тела крыс ДТ-группы составляла около 72 % аналогичного значения у животных группы К (соответственно 108.0 ± 12.1 и 149.5 ± 12.7 г). Следует отметить, что при воспроизведении модели классического алиментарного авитаминоза В₁ (с полным отсутствием тиамин в диете снижение) массы наблюдается уже через две недели, а на четвертой неделе у животных проявляются отчетливые признаки бери-бери (судороги, параличи) [23]. В нашем случае, когда крысы получали витамин, но лишь 15–20 % суточной нормы [18], через шесть недель мы не наблюдали у них соответствующих характерных признаков острого авитаминоза. Однако уже начиная с четвертой недели отмечались вялость, потеря активности, падение массы тела.

Показатели окислительно-восстановительного баланса метаболических процессов. В литературе активно обсуждается предположение, что оксидативный стресс является главным фактором, обуславливающим нейродегенеративные изменения при В₁-дефиците. С учетом этого в мозгу крыс всех групп мы определяли такие показатели, как уровни РФК и SH-групп, характеризующие окислительно-восстановительный баланс в церебральном метаболизме. Данные показатели измеряли в группе К, а также у животных группы ДТ до и после корректирующего

Т а б л и ц а 1. Нормированные уровни реактивных форм кислорода (РФК) и SH-групп (%) в ткани мозга экспериментальных животных

Т а б л и ц я 1. Нормовані рівні реактивних форм кисню (РФК) та SH-груп (%) у тканині мозку підслідних тварин

Показатель	Группа животных		
	контроль	дефицит тиамин (ДТ)	ДТ + тиамин
Уровень РФК в ткани мозга (первая серия опытов), %	100 ± 7.0	88.1 ± 8.1	78.9 ± 11.0
Уровень РФК в ткани мозга (вторая серия опытов), %	100 ± 8.0	78.0 ± 7.6*	84.3 ± 10.2
Уровень SH-группы в ткани мозга (первая серия опытов), %	100 ± 8.0	62.7 ± 9.0*	70.5 ± 10.9*
Уровень SH-группы в ткани мозга (вторая серия опытов), %	100 ± 7.3	59.3 ± 7.1*	72.9 ± 12.2*

П р и м е ч а н и е. **P* < 0.05 по сравнению с показателем в контрольной группе.

Т а б л и ц а 2. Уровни тиамин и тиаминдифосфата (TDP) в тканях экспериментальных животных

Т а б л и ц я 2. Рівні тіаміну та тіаміндифосфату (TDP) у тканинах експериментальних тварин

Показатель	Группа животных		
	контроль	дефицит тиамин (ДТ)	ДТ + тиамин
Общее содержание тиамин в печени (первая серия опытов), мг/% ткани (%)	4.20 ± 0.66 (100 %)	0.77 ± 0.21* (18.3 %)	2.90 ± 0.61+ (69.0)
Содержание TDP в крови (первая серия опытов), %	100 ± 10	39.7 ± 7.5*	63.0 ± 9.1*
Содержание TDP в мозгу (первая серия опытов), %	100 ± 10.0	46.4 ± 11.8*	71.4 ± 6.7*
Содержание TDP в мозгу (вторая серия опытов), %	100 ± 7.4	39.6 ± 4.2*	67.1 ± 8.6**

Примечание. * $P < 0.05$ по сравнению с показателем в группе крыс гиповитаминозом (ДТ). Остальные обозначения те же, что и в табл. 1.

введения тиамин в дозах 0.1 и 2.0 мг/кг массы тела.

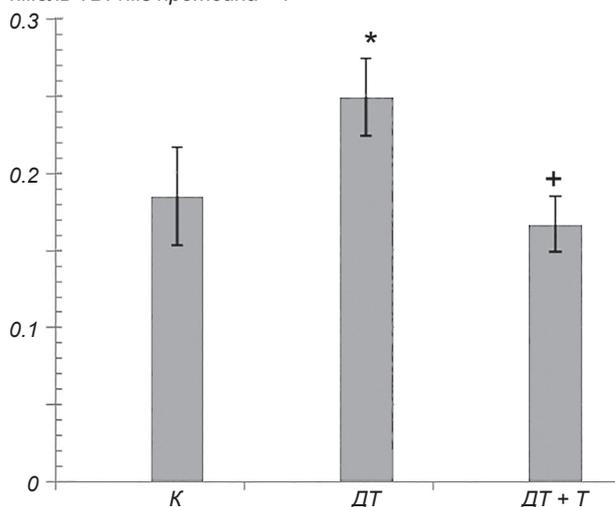
При гиповитаминозе уровни SH-групп и РФК были достоверно снижены (табл. 1), что может свидетельствовать об уменьшении интенсивности обменных процессов на последних этапах развития гиповитаминоза. Введение тиамин в дозе 0.1 мг/кг массы тела не влияло существенно на упомянутые выше показатели, однако применение этого витамина в значительно большей дозе (2.0 мг/кг) обуславливало достаточную отчетливую тенденцию к нормализации окислительно-восстановительного баланса.

Показатели, характеризующие обмен тиамин в головном мозгу и периферических тканях. Для того, чтобы охарактеризовать обеспеченность организма витамином B_1 и состояние его обмена, мы оценивали общее содержание тиамин в печени, содержание TDP в крови, а также содержание TDP и активность ТРК в ткани мозга. Результаты этих исследований приведены в табл. 2.

Было обнаружено, что в печени крыс с алиментарным B_1 -дефицитом уровень общего тиамин был более чем на 80 % ниже по сравнению с контролем. В крови и тканях мозга декремент количества биологически активной формы тиамин (TDP) составлял в среднем около 60 %. Согласно экспериментальным данным, полученным ранее [24], при ограничении поступления тиамин в организм снижение уровней тиамин и TDP происходит прежде всего в периферических тканях и лишь в последнюю очередь – в мозгу. Очевидно, организм до последней возможности поддерживает упомянутые показатели в нервных клетках на более адекватном уровне за счет «перекачки» витамина из других органов. Тот факт, что на нашей модели наблюдалось существенное снижение уровня TDP в

ткани мозга, свидетельствует о весьма глубоком дефиците витамина B_1 в организме. При одноразовом поступлении тиамин в обеих использованных нами дозах (0.1 и 2.0 мг) в организм животных с B_1 -гиповитаминозом за сутки до декапитации отмечалась тенденция к повышению упомянутых показателей. В случае первой упомянутой дозы эта тенденция была крайне слабой, а заметное повышение содержания TDP в ткани мозга обеспечивалось

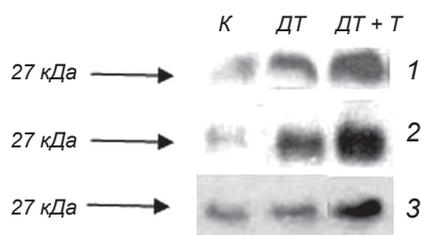
нмоль TDP/мг протеина · ч



Р и с. 1. Средние значения активности тиаминпирофосфокиназы (нмоль тиаминдифосфата (TDP)/мг протеина · ч) в ткани мозга животных трех экспериментальных групп.

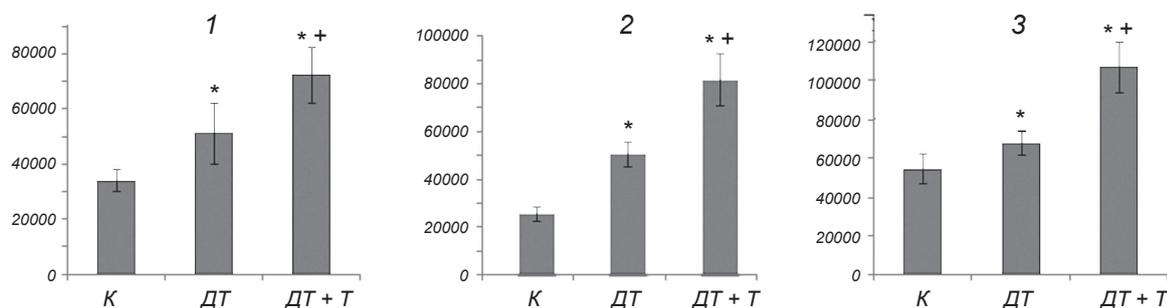
К – группа контроля; ДТ – группа с дефицитом тиамин; ДТ + Т – группа ДТ после введения тиамин (группа с коррекцией). * $P < 0.05$ по сравнению с показателем группы К, + $P < 0.05$ по сравнению с показателем в группе ДТ.

Р и с. 1. Середні значення активності тіамінпирофосфокиназы (нмоль тіаміндифосфату/мг протеїну · год) у тканині мозку тварин трьох експериментальних груп.



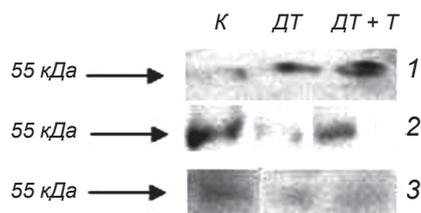
Р и с. 2. Блотогаммы тиаминпирофосфокиназы. 1 – кора больших полушарий, 2 – мозжечок, 3 – гиппокамп. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Р и с. 2. Блотограми тіамінпірофосфокінази.



Р и с. 3. Содержание тиаминпирофосфокиназы в различных отделах головного мозга крыс трех экспериментальных групп. Обозначения те же, что и на рис. 1 и 2.

Р и с. 3. Вміст тіамінпірофосфокінази у різних відділах головного мозку щурів трьох експериментальних груп.



Р и с. 4. Блотогаммы транспортера тиамин THTR-1. Обозначения те же, что и на рис. 2.

Р и с. 4. Блотограми транспортера тіаміну THTR-1.

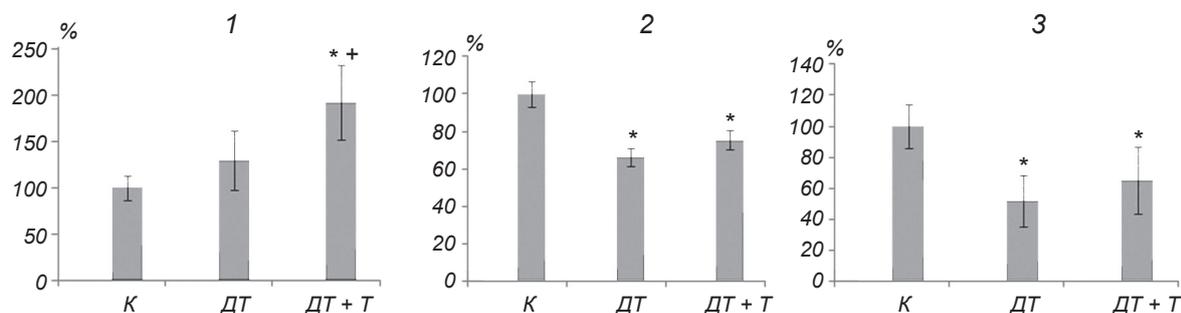
путем введения тиамин в высокой дозе (2.0 мг). Однако и в этом случае сохранялось достоверное отличие данного показателя от контрольных значений.

Приведенные выше результаты могут быть связаны с тем, что при хроническом дефиците витамина В₁ происходят изменения в структуре протеинов, ответственных за его обмен (а возможно, и других протеинов, в том числе протеинов цитоскелета). Одноразовое введение витамина даже в высокой дозе не обеспечивает полную коррекцию этих нарушений.

Согласно современным представлениям, ТРК является ферментом, ответственным за синтез ТДР в живых клетках, и он локализован в цитозоле. Полагают, что указанный фермент тесно ассоциирован с

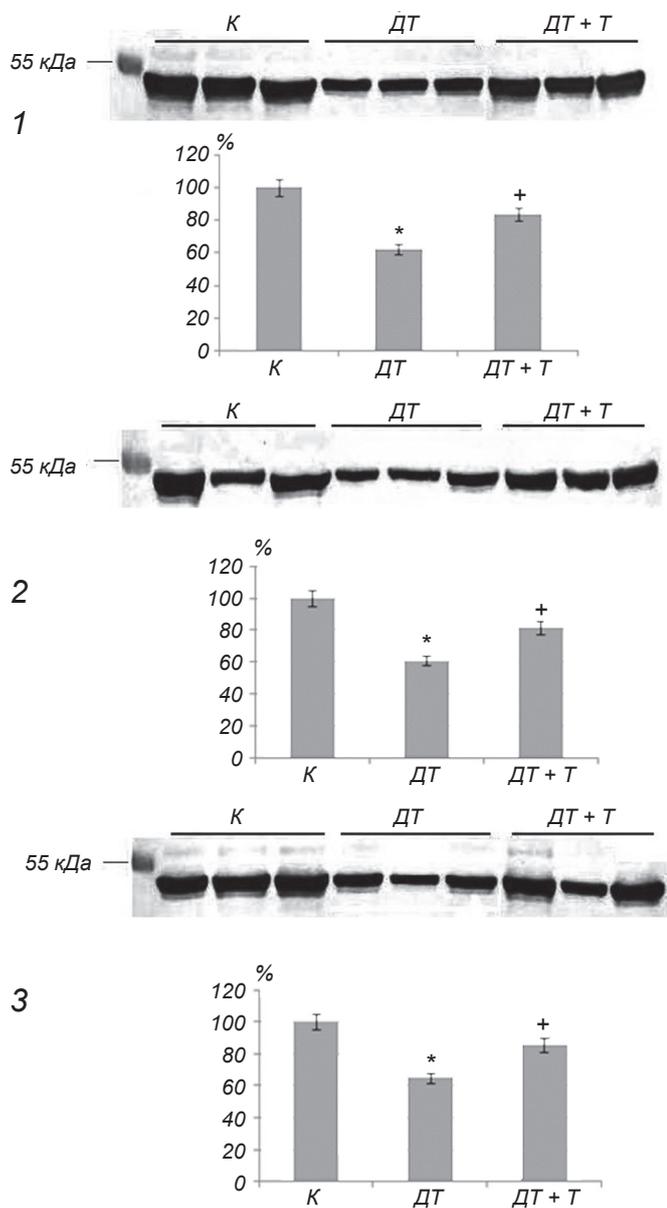
внутренней стороной плазматических мембран, так как транспорт и фосфорилирование тиамин тесно сопряжены во времени [25]. Механизмы регуляции активности упомянутого фермента изучены недостаточно; в частности, четкие представления о том, какие изменения могут происходить с этим ферментом при хронической недостаточности тиамин в организме, пока отсутствуют. Учитывая вышесказанное, мы анализировали активность ТРК в тканях мозга экспериментальных животных второй серии, а также оценивали уровень данного протеина-фермента в нескольких отделах мозга с использованием методики иммуноблотинга.

Оценки активности ТРК в гомогенате ткани целого мозга (рис. 1) свидетельствовали о явной тенденции к повышению этого показателя при дефи-



Р и с. 5. Нормированное содержание транспортера тиамину ТНТR-1 в различных отделах головного мозга крыс трех экспериментальных групп. Обозначения те же, что и на рис. 1 и 2.

Р и с. 5. Нормований вміст транспортера тіаміну ТНТR-1 у різних відділах головного мозку щурів трьох експериментальних груп.



ците тиамину и приближении его к контрольному значению после введения животным с ДТ за сутки до декапитации 2.0 мг/кг указанного витамина.

Результаты иммуноблотинга ТРК в отделах головного мозга крыс. Согласно данным литературы, интенсивность обмена тиамину и, соответственно, реакция на недостаточность данного витамина в организме в различных отделах головного мозга неодинаковы [26]. Наиболее активной структурой в аспекте метаболизма тиамину и его производных считается мозжечок. В частности, в этой области головного мозга были обнаружены наивысшая активность ТРК (в два раза выше аналогичного показателя в гиппокампе) [27], а также наибольший диапазон изменения активности пируватдегидрогеназного комплекса [28]. Кора больших полушарий, видимо, более устойчива к нарушениям обмена тиамину, чем мозжечок; в коре более или менее адекватный уровень метаболизма указанного витамина в норме сохраняется при ДТ дольше [29].

Полученные нами данные показали, что в условиях ДТ содержание ТРК в коре повышено примерно на 50 %, в мозжечке – почти вдвое, а в гиппокампе – на 20 % относительно контроля ($P < 0.05$). Одноразовое введение тиамину обуславливало резкий рост уровня этого показателя в коре, мозжечке и гиппокампе (на 110, 210 и 190 % соответственно).

Р и с. 6. Результаты иммуноблотинга глиального фибриллярного кислого протеина (GFAP) в разных отделах головного мозга крыс. За 100 % принят контроль. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1 и 2.

Р и с. 6. Результати імуноблотингу гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) у різних відділах головного мозку щурів.

Изменения содержания THTR-1 в отделах головного мозга крыс. Содержание транспортера тиамин в исследуемых отделах мозга изменялось разнонаправленно. При дефиците данного витамина этот показатель в мозжечке и гиппокампе был снижен почти в полтора и два раза соответственно, тогда как в коре больших полушарий наблюдалось увеличение содержания THTR-1 на 30 % относительно контроля. Введение тиамин обуславливало тенденцию к повышению упомянутого показателя в мозжечке и гиппокампе (примерно на 20 % относительно уровня в мозгу животных с ДТ). В коре же отмечалось весьма резкое увеличение содержания THTR-1 – почти вдвое по сравнению с соответствующим индексом в группе К.

Изменения уровня GFAP в отделах головного мозга крыс. Данные иммуноблотинга свидетельствуют о том, что развитие ДТ у крыс приводит к снижению уровня GFAP во всех исследуемых отделах мозга (в среднем до 60 % контрольного значения). Одноразовое введение тиамин в высокой дозе обуславливало частичное восстановление содержания данного астроцитарного маркера, которое в разных отделах мозга увеличивалось примерно до 80 % контрольного значения. Достоверность отличия от показателя в группе ДТ, однако, сохранялась. Данные об уменьшении количества GFAP в различных отделах головного мозга крыс в условиях ДТ, полученные в нашей работе, согласуются с результатами ранее выполненных исследований [33]. Можно предположить, что абerrации цитоскелетных структур, связанные с нехваткой тиамин, представляют собой важный аспект развития астроглиальной дисфункции при ДТ.

Известно, что астроциты выполняют в ЦНС ряд ключевых функций. Эти элементы глии обеспечивают трофику и защиту нейронов, поддерживают целостность гемато-энцефалического барьера, участвуют в рециклинге нейротрансмиттеров; эти глиоциты вовлечены в поддержание гомеостаза ионов и водного окружения [30]. Ряд исследователей пришли к выводу, что в головном мозгу астроциты являются главной клеточной мишенью при ДТ [14, 15]. Одной из причин особой чувствительности астроцитов к нехватке тиамин является зависимость их функционирования от работы цикла трикарбоновых кислот (ЦТК). Установлено, что содержание ферментов ЦТК, в частности кетоглутаратдегидрогеназного комплекса (который лимитирует скорость работы всего цикла), превышает таковое в нейронах. Так, активность аэробного ме-

таболизма в астроцитах коры мозга на 30 % превышает интенсивность данного процесса в нервных клетках [31]. В связи с этим ДТ особо негативно отражается на метаболических процессах в астроцитах, что часто приводит к их дегенерации, нарушению глия-нейронных взаимодействий и развитию нейродегенеративных состояний. Одним из общих проявлений нарушения функционирования астроцитов является снижение уровней экспрессии их специфических белков, в частности GFAP [32]. Этот гистоспецифический компонент промежуточных филаментов цитоскелета астроцитов отвечает за морфологические перестройки данных клеток, внутриклеточный транспорт, поддержание адекватных характеристик клеточной адгезии и формирование межклеточных контактов [33]. Подтверждением наличия взаимосвязи активации тиаминзависимых процессов и синтеза цитоскелетного белка GFAP является увеличение экспрессии указанного протеина в мозгу крыс с ДТ после введения им тиамин. Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что цитоскелетные структуры астроглии в существенной степени вовлечены в реализацию компенсаторного ответа ЦНС в условиях ДТ.

Данные, полученные в ходе нашей работы, позволяют сделать несколько предварительных выводов, изложенных ниже. Повышение содержания ТРК во всех исследованных отделах головного мозга при снижении активности этого энзима в общем гомогенате тканей мозга животных с ДТ может быть связано как с усилением синтеза ТРК, так и с накоплением соответствующего протеина в неактивной форме. Возможно, не последнюю роль в упомянутом феномене играют изменения в степени окисленности данного протеина в результате изменения редокс-баланса в ходе реализации метаболических процессов в целом. Напрашивается также вывод о том, что в условиях критического снижения уровня GDP регуляция экспрессии ТРК может осуществляться в соответствии с принципом рибосвитча (РНК-«переключателя») регуляторного сегмента молекулы информационной РНК, с которой связывается низкомолекулярное соединение; это приводит к модуляции синтеза белков, кодируемых мРНК) [34]. Разовое же введение тиамин животным с гиповитаминозом В₁, вероятно, способствовало переходу ТРК в активную конформацию, что обуславливало дополнительное повышение измеренного содержания этого протеина. В целом результаты нашей работы указывают на воз-

можность эффективной тиаминзависимой регуляции интенсивности синтеза и функционального состояния ТРК в клетках ЦНС.

Такой факт, как разнонаправленность изменений содержания THTR-1 в исследованных отделах мозга при различной обеспеченности организма крыс тиаминем, видимо, требует дальнейших исследований. Однако уже на основании полученных данных можно предположить, что этот показатель не зависит напрямую от уровня поступления тиамина. Скорее всего, изменения в состоянии транспортера тиамина коррелируют с изменениями протеинов цитоскелета и мембранных протеинов, зависящими от характеристик метаболических процессов.

Значительное уменьшение содержания GFAP в различных отделах головного мозга крыс в условиях недостаточного поступления тиамина свидетельствует о развитии интенсивной астроглиальной дисфункции, обусловленной ДТ. Подобная дисфункция, очевидно, является одним из ключевых феноменов, определяющих патогенез негативных изменений деятельности головного мозга при дефиците V_1 в организме. Нормализация тиаминзависимых процессов в условиях введения этого витамина животным с ДТ способствует восстановлению метаболической активности клеток астроглии, что имеет важное значение для реализации ее нейротекторной функции.

В работе были соблюдены правила содержания и использования лабораторных животных, соответствующие принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1985), а также «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденные Комиссией по досмотру, содержанию и использованию экспериментальных животных Института биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины.

У всех авторов – А. С. Павловой, С. П. Степаненко, Л. И. Чеховской, А. А. Тихомирова и Ю. М. Пархоменко – отсутствуют какие-либо конфликты, касающиеся коммерческих или финансовых отношений, отношений с организациями или лицами, которые каким-либо образом могли быть связаны с исследованием, и взаимоотношений соавторов статьи.

О. С. Павлова¹, С. П. Степаненко¹, Л. И. Чехівська¹,
А. О. Тихомиров¹, Ю. М. Пархоменко¹

ЗАЛЕЖНІСТЬ ПОКАЗНИКІВ МЕТАБОЛІЗМУ
ВІТАМІНУ V_1 І СТАНУ АСТРОГЛІЇ В МОЗКУ ЩУРІВ
ВІД НАДХОДЖЕННЯ ДАНОГО ВІТАМІНУ В ОРГАНІЗМ

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

Резюме

Відтворена модель гіповітамінозу V_1 на щурах, котрі протягом шести тижнів щоденно отримували в раціоні лише близько 20 % необхідної кількості тиаміну. В цих умовах загальний вміст вітаміну V_1 (тиаміну) в печінці складав у середньому 18.3 % контрольних значень, а вміст тиаміндіфосфату (TDP) у крові і тканинах мозку – 40 %. Загальні показники окисно-відновного базису (рівні активних форм кисню – РФК – та вільних SH-груп) також були зниженими. Активність тиамінпірофосфокінази (ТРК) у цільному гомогенаті мозку тварин із дефіцитом тиаміну виявилася на 35 % вищою, ніж у контролі. В трьох відділах мозку (кора, мозочок і гіпокамп) виміряли вміст протеїнів, що беруть участь в обміні тиаміну, – транспортера тиаміну (THTR) і ТРК. При ДТ спостерігалася різна спрямованість змін показників для двох протеїнів: вміст ТРК у всіх відділах мозку підвищувався, в той час як вміст THTR в мозочку та гіпокампі знижувався. В умовах одноразового введення тиаміну в дозі 2.0 мг/кг маси тваринам із ДТ за добу до кінця експерименту вміст ТРК у всіх відділах мозку підвищувався. У разі THTR такий ефект спостерігався тільки в корі; в мозочку і гіпокампі реакція на введення тиаміну не була яскраво вираженою. Одночасно в усіх відділах мозку визначали вміст гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) – маркера астроцитів. Цей показник стабільно знижувався в усіх відділах мозку при ДТ і наближувався до контрольного рівня в умовах одноразового введення тиаміну. Обговорюється можливий зв'язок змін вмісту ключових протеїнів, задіяних в обміні тиаміну, із забезпеченістю організму даним вітаміном.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. S. S. Jhala and A. S. Hazell, "Modeling neurodegenerative disease pathophysiology in thiamine deficiency: consequences of impaired oxidative metabolism," *Neurochem. Int.*, **58**, No. 3, 248-260 (2011).
2. I. Bubko, B. M. Gruber, and E. L. Anuszewska, "The role of thiamine in neurodegenerative diseases," *Postepy Hig. Med. Dosw.*, **21**, No. 69, 1096-1106 (2015).
3. L. C. Vedder, J. M. Hall, K. R. Jabrouin, et al., "Interactions between chronic ethanol consumption and thiamine deficiency on neural plasticity, spatial memory, and cognitive flexibility," *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **39**, No. 11, 2143-2153 (2015).
4. J. M. Hall and L. M. Savage, "Exercise leads to the re-emergence of the cholinergic/nestin neuronal phenotype within the medial septum/diagonal band and subsequent rescue of both hippocampal ACh efflux and spatial behavior," *Exp. Neurol.*, **278**, 62-75 (2016).
5. A. Santos-Miranda, J. S. Cruz, and D. Roman-Campos, "Electrical properties of isolated cardiomyocytes in a rat model of thiamine deficiency," *Arq. Bras. Cardiol.*, **104**, No. 3, 242-245 (2015).
6. O. Kennet, A. Shahi, C. Freeman, et al., "Thiamine deficiency

- and delirium,” *Innov. Clin. Neurosci.*, **10**, No. 4, 26-32 (2013).
7. Y. Höller, M. Storti, M. Christova, et al., “Thiamine deficiency induced neurochemical, neuroanatomical, and neuropsychological alterations: a reappraisal,” *Sci. World J.*, **2013**, 1-7 (2013).
 8. R. F. Butterworth, *Thiamin. Modern Nutrition in Health and Disease*, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore (2006).
 9. K. Antel, N. Singh, B. Chisholm, et al., “Encephalopathy after persistent vomiting: Three cases of non-alcohol-related Wernicke’s encephalopathy,” *South Afr. Med. J.*, **105**, No. 6, 442-443 (2015).
 10. D. Lonsdale, “A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives,” *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, **3**, No. 1, 49-59 (2006).
 11. V. S. Subramanian, J. S. Marchant, I. Parker, et al., “Cell biology of the human thiamine transporter-1 (hTHTR1). Intracellular trafficking and membrane targeting mechanisms,” *Biol. Chem.*, **278**, No. 6, 3976-3984 (2003).
 12. G. Rindi and U. Laforenz, “Thiamine intestinal transport and related issues: recent aspects,” *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **224**, No. 4, 246-255 (2000).
 13. L. Bettendorff and P. Wins, “Mechanism of thiamine transport in neuroblastoma cells. Inhibition of a high affinity carrier by sodium channel activators and dependence of thiamine uptake on membrane potential and intracellular ATP,” *J. Biol. Chem.*, **269**, No. 20, 14379-14385 (1994).
 14. S. Afadla, R. Labetoull, and A. S. Hazel, “Role of astrocytes in thiamine deficiency,” *Metab. Brain Dis.*, **29**, No. 4, 1061-1068 (2014).
 15. A. S. Hazel, “Astrocytes are a major target in thiamine deficiency and Wernicke’s encephalopathy,” *Neurochem. Int.*, **55**, Nos. 1/3, 129-135 (2009).
 16. E. M. Hol and M. Pekny, “Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system,” *Current Opin. Cell. Biol.*, **32**, 121-130 (2015).
 17. P. Bai, M. Bennion, and C. J. Gubler, “Biochemical factors involved in the anorexia of thiamin deficiency in rats,” *J. Nutr.*, **101**, No. 6, 731-737 (1971).
 18. И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария и др., *Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте*, Вища шк., Киев (1983).
 19. H. U. X. Bergmeyer, *Methoden der Enzymatischen Analyse*, Tomo II, Verlag Chemie, Weinheim (1974).
 20. С. Е. Северин, Г. А. Соловьева, *Практикум по биохимии*, Изд-во МГУ, Москва (1989).
 21. Iu. M. Parkhomenko, I. I. Sterpuro, G. V. Donchenko, et al., “Oxidized derivatives of thiamine: formation, properties, biological role,” *Ukr. Biokhim. Zh.*, **84**, No. 6, 5-24 (1999).
 22. U. K. Laemmli, “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage,” *Nature*, **227**, No. 15, 680-685 (1970).
 23. N. Huertas-González, V. Hernando-Requejo, Z. Luciano-Garcia, et al., “Wernicke’s encephalopathy, wet beriberi, and polyneuropathy in a patient with folate and thiamine deficiency related to gastric phytobezoar,” *Case. Rep. Neurol. Med.*, **2015**, 624-807 (2015).
 24. В. Н. Туманов, Р. В. Требухин, “Межклеточное перераспределение тиамин при развитии дефицита витамина В₁ у мышей”, *Вопр. питания*, **6**, 49-52 (1987).
 25. M. M. Petrovic, L. Scepanovic, G. Rosic, et al., “Properties of thiamine transport in isolated perfused hearts of chronically alcoholic guinea pigs,” *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **86**, No. 4, 160-165 (2008).
 26. U. Laforenza, C. Patrini, G. Gastaldi, et al., “Effects of acute and chronic ethanol administration on thiamine metabolizing enzymes in some brain areas and in other organs of the rat,” *Alcohol Alcohol.*, **25**, No. 6, 591-603 (1990).
 27. T. Matsuda, Y. Yabushita, T. Doi, et al., “Regional distribution of thiamin pyrophosphokinase in rat brain,” *Experientia*, **41**, No. 7, 924-925 (1984).
 28. В. А. Розанов, Ю. М. Пархоменко, “Пируват- и оксоглутаратдегидрогеназная активности различных отделов головного мозга крыс”, *Укр. биохим. журн.*, **59**, № 6, 49-54 (1987).
 29. C. Patrini, A. Nauti, and G. Rindi, “Thiamine pyrophosphate-dependent and thiamine metabolizing enzymes in the deafferented cerebellum and in the intact cerebral cortex of rat,” *Met. Brain Dis.*, **13**, No. 1, 21-27 (1998).
 30. M. V. Sofroniew and H. V. Vinters, “Astrocytes: biology and pathology,” *Acta Neuropathol.*, **119**, No. 1, 7-35 (2010).
 31. V. Lebon, K. F. Peterse, G. W. Cline, et al., “Astroglial contribution to brain energy metabolism in humans revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy: elucidation of the dominant pathway for neurotransmitter glutamate repletion and measurement of astrocytic oxidative metabolism,” *J. Neurosci.*, **22**, No. 5, 1523-1531 (2002).
 32. J. Rintala, P. Jaatinen, K. Kiiänmaa, et al., “Dose-dependent decrease in glial fibrillary acidic protein-immunoreactivity in rat cerebellum after lifelong ethanol consumption,” *Alcohol*, **23**, No. 1, 1-8 (2001).
 33. А. А. Тыхомыров, А. С. Павлова, and V. S. Nedzvetsky, “Glial fibrillary acidic protein (GFAP): on the 45th anniversary of its discovery,” *Neurophysiology*, **48**, No. 1, 54-71 (2016).
 34. J. Miranda-Ríos, “The THI-box riboswitch, or how RNA binds thiamin pyrophosphate,” *Structure*, **15**, No. 3, 259-265 (2007).