

## НАРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА ТИАМИНА В МОЗГУ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛКОГОЛИЗМЕ И ВОЗМОЖНОСТЬ ИХ КОРРЕКЦИИ ВИТАМИНОМ Е

Ю. М. ПАРХОМЕНКО, С. Ю. ПИЛИПЧУК, А. А. СИДОРОВА,  
С. П. СТЕПАНЕНКО, Л. И. ЧЕХОВСКАЯ, Г. В. ДОНЧЕНКО

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;  
e-mail: yurpark@biochem.kiev.ua*

*Исследовано влияние хронического употребления алкоголя на биохимические процессы обмена тиамин в мозгу крыс. Показано, что при хроническом действии алкоголя содержание тиаминдифосфата в тканях мозга не изменяется, хотя происходит существенное снижение активности тиаминкиназы. В этих условиях уменьшается также способность изолированных нервных окончаний (синапсом) поглощать меченый тиамин. Такие изменения вероятно приводят к уменьшению скорости обмена лабильного пула тиамин в нервных клетках, следствием чего является наблюдаемое снижение активности пируватдегидрогеназного комплекса (ПДК) за счет его инактивации фосфорилированием.*

*Исследована тиаминсвязывающая и тиаминтрифосфатазная активность тиаминсвязывающего белка (ТСБ) в составе плазматических мембран синапсом (ПМС), изолированных из мозга крыс различных экспериментальных групп. Показано увеличение как тиаминсвязывающей, так и тиаминтрифосфатазной активности относительно контроля в ПМС, изолированных из мозга крыс с моделью хронического алкоголизма. Кинетические исследования свидетельствуют о повышении в этих условиях средства ПМС (ТСБ) к тиамину и тиаминфосфатам.*

*Введение витамина Е крысам, у которых моделировали хронический алкоголизм, приводит к нормализации активности ПДК в изолированных нервных окончаниях, что может свидетельствовать о временном характере этих изменений. Неспособность витамина Е нормализовать биологическую активность ТСБ в составе ПМС может быть связано с серьезными нарушениями в структуре ПМС, или ТСБ в их составе, в условиях хронического действия алкоголя.*

*Ключевые слова: тиамин, витамин Е, алкоголизм, метаболизм, синапсомы, тиаминсвязывающий белок.*

**Д**ефицит витамина В<sub>1</sub> (тиамин) при длительном потреблении алкоголя является общепризнанным фактом и считается одной из причин развития нейродегенеративного заболевания хронических алкоголиков – синдрома Корсакова-Вернике [1, 2], которое по симптоматике и характеру метаболических нарушений сравнивается с болезнью бери-бери (алиментарный В<sub>1</sub>-авитаминоз). Однако данные относительно влияния этанола на биохимические процессы, принимающие участие в обмене и функционировании тиамин в нервных клетках, довольно ограничены. Достоверно установленным фактом является снижение в ткани мозга под влиянием хронического потребления алкоголя активности тиаминкиназы (КФ 2.7.6.2), энзима, принимающего участие в пирофосфорилировании тиамин с образованием его коферментной формы – тиаминдифосфата (ТДФ) [3, 4].

Тиамин является серосодержащим соединением, которое может легко окисляться в тканях *in vivo* с образованием дисульфидных форм тиамин и его фосфатов [5]. Таким образом, обмен тиамин в определенной мере зависит от обмена низкомолекулярных серосодержащих соединений, в частности глутатиона, уровень которого в тканях является индикатором состояния системы антиоксидантной защиты. Данные литературы свидетельствуют о нарушении этой системы в тканях алкоголиков [6, 7] и о снижении в них уровня глутатиона. В то же время известно, что витамин Е, природный антиоксидант, активирует процессы транссульфирования и трансметилирования в тканях, что приводит к активации в них синтеза глутатиона [8].

Функциональная взаимосвязь обмена тиамин и витамина Е изучена очень мало. Проведенные нами ранее исследования свиде-

тельствуют о повышении уровня TDP в тканях  $B_1$ -дефицитных животных при дополнительном введении им витамина Е одного или вместе с метионином даже без введения тиамин [9]. Это дало нам основание предположить, что витамин Е может способствовать либо активации фосфорилирования эндогенного тиамин, либо восстановлению его окисленных производных (дисульфидов).

Следует отметить также, что ранее на животных с моделью хронического алкоголизма было показано, что длительное потребление алкоголя не влияет существенно на уровень витамина Е в печени [10]. Учитывая все вышесказанное, в данной работе мы использовали дополнительное введение витамина Е животным с моделью хронического алкоголизма с целью повышения в тканях уровня этого природного антиоксиданта и, таким образом, отдифференцировать в изучаемых показателях обмена тиамин обратимые изменения, обусловленные нарушением системы антиоксидантной защиты под влиянием потребления алкоголя, и более глубокие необратимые изменения.

### Материалы и методы

**Модель хронического алкоголизма.** В эксперименте использованы самцы крыс с массой тела 80–120 г, которых предварительно отбирали, используя «двухбутылочный» метод для установления склонности животных к этанолу [10]. Для получения модели алкогольной зависимости отбирали животных, которые предпочитали этанол. Эксперимент по получению хронической алкогольной зависимости продолжался около 4 месяцев. На протяжении этого срока животных содержали в отдельных клетках на рационе вивария, единственным источником жидкости для них служил 15%-й раствор этилового спирта, в контрольной группе – вода. За 5 дней до окончания эксперимента половине животных с моделью хронического алкоголизма начинали вводить витамин Е (рег ос с помощью зонда) в дозе 5 мг на 1 кг массы тела ежедневно без отмены алкоголя.

**Метод выделения субклеточных структур.** Все операции по выделению субклеточных структур проводили при 0–4 °С с добавлением в буфер ингибитора протеаз – ФМСФ (0,5–1 мМ). Синапсомы, митохондрии и фракцию плазматических мембран синапсом (ПМС) получали, используя стандартный метод дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [11]. Контроль чистоты субклеточных фракций осуществля-

ли с помощью электронной микроскопии и по активности маркерных ферментов.

Связывание тиамин с изолированными ПМС исследовали с помощью радиолигандного метода с использованием меченного по углероду [тиазол-2- $^{14}C$ ]тиамин (уд. р.а. 25.7 мКи/мМ) в 0,05 М Рингер-бикарбонатном буфере, pH 7,4, состава (в мМ): NaCl – 125; KCl – 4,5; CaCl<sub>2</sub> – 2,5; KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,3; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 1,3; NaHCO<sub>3</sub> – 17,6; глюкоза – 11), как описано ранее [12]. Радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-20 Intertechique (Франция). Специфическое связывание определяли по разнице между общим связыванием (инкубация только с меченым тиамином) и неспецифическим (инкубация с меченым тиамином в присутствии 100-кратного избытка немеченого тиамин). Удельную активность выражали как количество пмоль тиамин, связавшегося с 1 мг белка при указанных выше условиях за 10 мин. Аналогичным образом анализировали связывание тиамин нативными синапсомами.

Концентрацию TDP анализировали энзимным методом с использованием апоэнзима дрожжевой пируватдекарбоксилазы как описано ранее [12]. Определяли снижение NADH в сопряженной реакции восстановления образовавшегося ацетальдегида алкогольдегидрогеназой по изменению оптической плотности при  $\lambda$  340 нм. Количество образовавшегося TDP определяли по калибровочной кривой, которая строилась с определенными концентрациями хроматографически чистого TDP. Апоформу пируватдекарбоксилазы получали из *Saccharomyces carlsbergensis* методом, описанным в работе [12]. Для определения содержания дисульфидной формы TDP использовали предварительную инкубацию пробы с дитиотреитолом [12] и по разнице между показателем для этой пробы и пробы, инкубированной без добавления дитиотреитола, рассчитывали содержание дисульфида TDP.

Активность тиаминтрифосфатазы (ТТР-аза) определяли при 37 °С во фракции ПМС в стандартной среде инкубации (объем 0,25 мл), которая содержала: 50 мМ трис-НСI-буфер, pH 7,4, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20–100 мкМ ТТР, время инкубации – 20 мин. Энзимную реакцию инициировали введением в среду инкубации суспензии ПМС (50 мкг белка) и останавливали разведением, добавляя 1 мл 0,05 М Na-фосфатного буфера, pH 6,8. Для подсчета количества образовавшегося TDP 0,1 мл реакционной смеси инкубировали в течение 30 мин при 25 °С с апоПДК, далее определяли TDP в сопряженной с АДГ реакции по снижению

экстинкции NADH при 340 нм, как указано выше. Активность тиаминкиназы в цитозольной фракции оценивали по образованию TDP при инкубации энзимного препарата с тиаминном, как описано ранее [13], активность пируватдегидрогеназного комплекса (ПДК) – по ранее описанному в работе [14] методу, уровень восстановленного глутатиона – по содержанию свободных SH-групп, определяемых с помощью реактива Еллмана [15], содержание малонового диальдегида (МДА) – с помощью тиобарбитуровой кислоты [16], количество белка – по методу Лоури.

Полученные результаты обрабатывали статистически, используя *t*-критерий Стьюдента, кинетический анализ и статистическую обработку данных проводили с помощью программы Excel.

В работе использовали следующие реактивы: АТФ, пируват натрия, 2-тиобарбитуровую кислоту, 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту) (Sigma, США), трис(гидроксиметил)-аминометан, дигитонин (Merck, Германия), NADH, тиаминдифосфат (Fluka, Швейцария). Тиаминтрифосфат гидрохлорид был синтезирован и любезно предоставлен нам проф. В. Н. Сильниковым (Институт химической биологии и фундаментальной медицины РАН, Новосибирск), за что мы выражаем ему глубокую благодарность. Остальные реактивы были отечественного производства квалификации хч.

### Результаты и обсуждение

*Влияние алкоголя и витамина Е на синтез TDP в ткани мозга и печени.* Активация пероксидных процессов при алкогольной интоксикации [5, 6] является важным фактором нарушения метаболических процессов и снижения уровня активных форм некоторых коферментов и метаболитов. Поэтому, ставя целью данной работы изучить влияние длительного упо-

требления алкоголя и на этом фоне витамина Е на показатели обмена и функционирования тиамин в мозгу, мы сочли целесообразным определить и некоторые показатели, отражающие интенсивность протекания пероксидных процессов, а именно уровень восстановленного глутатиона и образование МДА. Об уровне восстановленного глутатиона мы судили по содержанию в тканях восстановленных SH-групп, исходя из известных данных о том, что среди низкомолекулярных тиолов глутатион составляет более 90% [17]. Соответственно в табл. 1 приведены данные по содержанию глутатиона (восстановленные SH-группы) и скорости образования МДА в тканях мозга и печени исследуемых животных.

Эти результаты подтверждают данные литературы о снижении в организме хронических алкоголиков уровня восстановленного глутатиона и повышении интенсивности пероксидных процессов. Кроме того, они свидетельствуют о том, что введение витамина Е животным с моделью хронического алкоголизма способствует частичной или полной нормализации этих показателей.

Сегодня является общепризнанным, что коферментной формой витамина В<sub>1</sub> является TDP, а его высокую нейроактивность связывают с другим фосфатом – тиаминтрифосфатом (ТТР). Первым энзимом на пути фосфорилирования тиамин является тиаминкиназа. Этот энзим осуществляет реакцию переноса пирофосфатной группы с АТФ на тиамин с образованием TDP, который, в свою очередь, является субстратом для образования ТТР при участии другого энзима – тиаминдифосфаткиназы. Таким образом, тиаминкиназа играет ключевую роль в обмене тиамин и соответственно в осуществлении его биохимических функций в нервной клетке. Поэтому мы сочли целесообразным определить активность этого

Таблица 1. Содержание SH-групп и образование МДА в тканях крыс различных экспериментальных групп ( $M \pm m$ ,  $n = 5-7$ )

Группы животных	Содержание SH-групп, мкмоль/г ткани		Скорость образования МДА, нмоль/г ткани за 1 час	
	мозг	печень	мозг	печень
Контрольная	1,43 ± 0,11	7,29 ± 0,49	225,3 ± 14,0	607,9 ± 15,6
С хроническим алкоголизмом	0,98 ± 0,11*	5,80 ± 0,34*	298,0 ± 25,0*	675,9 ± 17,2*
При введении витамина Е на фоне хронического алкоголизма	1,24 ± 0,10	7,13 ± 0,41	275,2 ± 34,3	524,3 ± 33,8 <sup>#</sup>

Здесь и далее данные, которые достоверно отличаются от таких же данных: \* в контрольной группе животных, <sup>#</sup> в группе животных с моделью алкоголизма

энзима и содержание продукта его деятельности — TDP в клетках мозга в условиях хронического действия алкоголя, а также влияние на эти показатели дополнительного введения экспериментальным животным витамина Е. Кроме того, имея в виду, что в неблагоприятных условиях в тканях могут образовываться и накапливаться окисленные формы тиамин и его фосфатов [5], в ткани мозга мы анализировали содержание дисульфида TDP.

Данные, приведенные в табл. 2, свидетельствуют о достоверном снижении активности тиаминкиназы в мозгу животных, у которых моделировали алкоголизм, что совпадает с данными литературы [3]. Введение таким крысам витамина Е на протяжении 5 дней способствует частичной нормализации этого показателя (достоверного отличия от этого показателя в группе контрольных животных не наблюдается). Несмотря на значительное снижение активности тиаминкиназы, снижение концентрации TDP в мозгу крыс с хроническим алкоголизмом не наблюдается, хотя содержание его дисульфида увеличивается.

Как уже упоминалось выше, с критическими нарушениями обмена тиамин в нервных клетках связывают развитие у хронических алкоголиков болезни Корсакова-Вернике [1,2]. Однако основным депо тиамин, как и других витаминов, является печень, поэтому нас интересовали изменения вышеуказанных показателей как в мозгу, так и в печени.

Данные, приведенные в табл. 3, свидетельствуют о том, что в печени животных с моделью алкоголизма значительно снижается содержание TDP при неизменной активности тиаминкиназы. Введение витамина Е таким животным не способствует нормализации уровня TDP в этом органе. Поскольку в ткани печени экспериментальных животных мы

не обнаружили накопления дисульфида TDP, можно предположить, что причиной снижения уровня TDP в данном случае может быть повышение под влиянием алкоголя скорости обмена тиамин в печени в результате перераспределения его между печенью и другими тканями, в частности мозгом.

*Влияние этанола на отдельные звенья лабильного пула тиамин в нервных клетках и активность ПДК.* Ранее на основании анализа результатов собственных исследований и данных литературы авторами этой статьи была предложена гипотеза относительно молекулярных механизмов, опосредующих участие тиамин и его биологически активных производных в реализации специфической функции нервных клеток [18]. Ключевыми положениями гипотезы являются представления о существовании в нервных окончаниях лабильного пула тиамин и его фосфатов, потенциалзависимая циркуляция его компонентов между пресинаптической щелью и внутриклеточным пространством, сопряжение обмена тиамин (его лабильного пула) с обменом АХ, опосредованное модулирующим влиянием производных тиамин на активность пируватдегидрогеназного комплекса (ПДК) и соответственно синтез ацетил-КоА как лимитирующего субстрата в синтезе АХ [18].

Важным звеном обмена лабильного пула тиамин и его фосфатов, по нашим представлениям, является ТСБ, локализованный в плазматической мембране нервных клеток [19, 20], и тиаминкиназа, которая, как уже было сказано выше, осуществляет первое фосфорилирование тиамин с образованием TDP. Согласно полученным нами данным, при длительном воздействии алкоголя существенно снижается способность нервных клеток фосфорилировать тиамин (табл. 2). Чтобы проверить, как эти из-

Таблица 2. Содержание TDP, дисульфида TDP и активность тиаминкиназы (ТК) в мозгу подопытных крыс различных групп ( $M \pm m$ ,  $n = 5-7$ )

Группы животных	Содержание TDP в активной форме, мкг/г влажной ткани	Содержание дисульфида TDP, мкг/г влажной ткани (среднее значение)	Активность ТК, пмоль TDP/мин на 1 мг белка
Контрольная	2,80 ± 0,42	0,12	0,86 ± 0,04
С хроническим алкоголизмом	2,83 ± 0,47	0,94	0,57 ± 0,05*
При введении витамина Е на фоне хронического алкоголизма	3,00 ± 0,51	0,10	0,48 ± 0,04*



Таблиця 3. Активність тиамінкінази (ТК) і вміст ТДР в печині крыс різних експериментальних груп ( $M \pm m$ ,  $n = 5-7$ )

Групи тварин	Вміст ТДР, мкг/г вологи тканини	Активність ТК, пмоль ТДР/мін на 1 мг білка
Контрольна	$9,80 \pm 1,26$	$1,17 \pm 0,12$
С хронічним алкоголізмом	$4,96 \pm 1,10^*$	$1,08 \pm 0,14$
При введенні вітаміна Е на фоні хронічного алкоголізму	$4,0 \pm 0,9^*$	$1,27 \pm 0,22$

мення впливають на здатність нервових кліток поглинати тиамін, ми провели досліди на синапсах, ізолюваних з мозку крыс різних груп.

Як видно з даних, наведених в табл. 4, при моделюванні алкоголізму спостерігається достовірне зниження поглинання меченого тиаміна синапсами, введення вітаміна Е не призводить до повної нормалізації цього показника.

Наші попередні дослідження переконливо показали, що ТСБ є біфункціональним: поряд зі здатністю специфічно зв'язувати тиамін він також вибірково гідролізує тиамінфосфати [19] і локалізований в плазматичних мембранах кліток [20]. Таким чином, ТСБ опосередковує перенос компонентів лабільного пула тиаміна через плазматичну мембрану: при захопті здійснюється негайне фосфорилування тиамінкіназою тиаміна в клітці, при деполяризації – дефосфорилування тиамінфосфатів і вивільнення в пресинаптичну щільність вільного тиаміна.

Щоб перевірити, як хронічне вживання алкоголю впливає на властивості ТСБ в

складі ПМС, далі ми досліджували здатність плазматичних мембран синапсом, ізолюваних з мозку крыс різних груп, специфічно зв'язувати мечений тиамін і гідролізувати тиамінфосфати.

Дані, наведені в табл. 4, свідчать про те, що в умовах хронічного впливу алкоголю здатність ПМС зв'язувати мечений тиамін достовірно зростає і, відповідно, це ланка лабільного пулу тиаміна не є лімітуючою в обміні вітаміна в нервових клітках.

В той же час кінетичні дослідження, проведені на препаратах ПМС, ізолюваних з мозку нормальних крыс і крыс з моделлю хронічного алкоголізму, показали, що в умовах хронічного впливу алкоголю зростає швидкість ПМС до тиаміну, о чому свідчить зниження майже вдвічі величини кажущоїся  $K_d$  для зв'язування тиаміна з ПМС (табл. 4), розрахованої за допомогою графічного методу [21]. Введення крысам з хронічним алкоголізмом вітаміна Е не призводить до корекції цього параметра.

Дані, зведені в табл. 5, свідчать про те, що і тиамінтрифосфатазна ак-

Таблиця 4. Зв'язування тиаміна нативними синапсами і плазматичними мембранами синапсом (ПМС), ізолюваними з мозку крыс різних експериментальних груп тварин ( $M \pm m$ ,  $n = 4-6$ )

Групи тварин	Кількість тиаміна, зв'язаного синапсами, пмоль/мг білка за 10 хв	Зв'язування тиаміна препаратами ПМС	
		Кількість зв'язаного тиаміна, пмоль/мг білка за 10 хв	Значення кажущоїся $K_d$ , мкМ
Контрольна	$45,72 \pm 2,82$	$72,50 \pm 7,52$	$0,273 \pm 0,021$
С хронічним алкоголізмом	$27,25 \pm 3,20^*$	$96,08 \pm 5,12^*$	$0,150 \pm 0,011^*$
При введенні вітаміна Е на фоні хронічного алкоголізму	$36,69 \pm 3,82$	$89,11 \pm 6,63$	$0,12 \pm 0,01^*$

тивность, присущая ТСБ, также повышается в ПМС при хроническом действии алкоголя. Величина  $K_m$  для ТТР также снижается, что может свидетельствовать о повышении сродства ПМС к этому соединению.

Таким образом, результаты оценки влияния хронического потребления алкоголя на свойства ТТР-азной активности ПМС свидетельствуют об увеличении под воздействием алкоголя сродства ТСБ к ТТР в составе ПМС.

Поскольку витамин Е не способен в данных условиях нормализовать нарушения свойств ТСБ в составе ПМС, можно допустить, что изменения, которые имеют место при хроническом потреблении алкоголя животными, касаются структуры мембраны или ТСБ. В соответствии с последними данными литературы, хроническое потребление алкоголя может способствовать появлению изоформ мембранного транспортера тиамин за счет изменений на генетическом уровне [22].

Согласно предложенной нами гипотезе, функционирование лабильного пула производных тиамин в нервной клетке сопряжено с регуляцией функционирования пируватдегидрогеназного комплекса (ПДК), продуктом которого является ацетил-КоА – лимитирующий предшественник в синтезе АХ [18]. Результаты исследований, проведенных нами ранее, позволили сделать вывод, что именно несвязанные с белками ТДР и ТТР, являющиеся составляющими лабильного пула производных тиамин, могут принимать участие в регуляции активности ПДК по механизму фосфорилирования–дефосфорилирования при участии специфических регуляторных энзимов: ПДГ-киназы и ПДГ-фосфатазы [23]. Хотя ПДК является важным звеном метаболизма нервных клеток и реализации специфической функции тиамин в них, до сих пор не известно как изменяется функциональная активность этого ферментного комплекса и активность его

регуляторных ферментов в условиях действия алкоголя.

Учитывая вышеизложенное, мы исследовали в митохондриях, изолированных из мозга животных различных экспериментальных групп, активность ПДК исходную и после активации эндогенной фосфатазой *in vitro* за счет повышения концентрации кальция в среде как описано ранее [14]. Приведенные на рисунке результаты свидетельствуют, что в условиях хронического потребления алкоголя активность ПДК снижается более чем на 40% по сравнению с контролем. Повышение этой активности до уровня контрольной группы животных при активации эндогенной фосфатазы *in vitro* свидетельствует о том, что снижение активности ПДК при хроническом действии алкоголя происходит за счет инактивации фосфорилированием первого энзима – пируватдекарбоксилазы. Исходя из того, что при активации эндогенной фосфатазы *in vitro* активность ПДК значительно повышается, можно допустить, что алкоголь прямо не влияет на свойства регуляторных белков ПДК, в частности ПДК-фосфатазы.

То обстоятельство, что при введении тиамин Е животным с моделью хронического алкоголизма активность ПДК в митохондриях мозга значительно повышается по сравнению с группой животных, которым не вводили витамин, и практически не отличается от значения такого же показателя в контрольной группе, может свидетельствовать о зависимости энзимной системы регуляции активности ПДК фосфорилированием – дефосфорилированием от уровня свободных SH-групп в клетках. Действительно, ранее было показано, что при критическом снижении уровня восстановленного глутатиона, которое наблюдается, в частности, при длительном действии алкоголя, страдают энзимы, содержащие в активном центре тиольные группы, к которым относятся энзимные

Таблица 5. ТТР-азная активность ПМС, изолированных из мозга животных разных экспериментальных групп, и кажущаяся величина  $K_m$  для ТТР ( $M \pm m$ ,  $n = 4-6$ )

Группы животных	Показатель	
	ТТР-азная активность, нмоль ТДР за 1 мин на 1 мг белка	$K_m$ , мкМ
Контрольная	0,80 ± 0,11	54 ± 7
С хроническим алкоголизмом	1,16 ± 0,11*	31 ± 7*
При введении витамина Е на фоне хронического алкоголизма	1,00 ± 0,09	36 ± 7*



Активність ПДК в мітохондріях мозгу крыс, определена без активации эндогенной фосфатазой и с активацией *in vitro*. Показатель достоверно отличается от: \* такого же в контроле, # от показателя в группе крыс при моделировании алкоголизма без активации эндогенной фосфатазы

белки пируватдегидрогеназного комплекса, а при повышении уровня восстановленного глутатиона, что происходит под воздействием введенного витамина E, эти показатели нормализуются [24].

Обобщая полученные нами в данном исследовании результаты, можно сделать вывод, что в условиях хронического употребления алкоголя происходит замедление обмена лабильного пула тиамин в нервных клетках за счет снижения активности тиаминкиназы и, по-видимому, замедления тиаминзависимых процессов в целом (судя по ситуации с ПДК), следствием чего и является относительно постоянный уровень TDP в клетках. Анализируя полученные данные по влиянию хронического потребления животными алкоголя и на этом фоне влияние витамина E на параметры обмена тиамин, следует отметить, что связывание (поглощение) тиамин нервными клетками больше зависит от активности тиаминкиназы, а не от тиаминсвязывающей активности ТСБ в составе плазматических мембран. Это наблюдение согласуется с современными представлениями о том, что при физиологической концентрации поглощение тиамин нормальными

клетками (без генетического дефекта тиамин-транспортера) лимитируется активностью тиаминкиназы, которая переводит поглощенный тиамин в более отрицательно заряженную форму – тиаминдифосфат и, по-видимому, определяет скорость обмена лабильного пула производных тиамин в клетке.

### ПОРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМУ ТИАМИНУ В МОЗГУ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АЛКОГОЛІЗМІ І МОЖЛИВІСТЬ КОРЕКЦІЇ ЇХ ВІТАМІНОМ E

Ю. М. Пархоменко, С. Ю. Пилипчук, А. О. Сидорова, С. П. Степаненко, Л. І. Чехівська, Г. В. Донченко

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна  
НАН України, Київ;  
e-mail: yupark@biochem.kiev.ua

Досліджено вплив хронічного вживання алкоголю на біохімічні показники обміну тиамину в мозку щурів. Показано, що в разі хронічної дії алкоголю вміст тиаминдифосфату у тканині мозку не змінюється, хоча відбувається істотне зниження активності тиаминкинази. За цих умов зменшується також здатність ізольованих нервових закінчень (синапсом) поглинати мічений тиамин. Ці зміни, ймовірно, призводять до уповільнення рухомого пулу тиамину в нервових клітинах, наслідком чого є зниження активності пируватдегидрогеназного комплексу (ПДК) за рахунок фосфорилування його першого ферментного білка.

Досліджено тиаминзв'язувальну та тиаминтрифосфатазну активність тиаминзв'язувального білка (ТЗБ) у складі плазматичних мембран синапсом (ПМС), ізольованих із мозку щурів різних експериментальних груп. Показано зростання активності обох ензимів відносно контролю в ПМС, ізольованих із мозку щурів із хронічним алкоголізмом. Кінетичні дослідження свідчать про збільшення спорідненості ПМС (ТЗБ) до тиамину і тиаминфосфатів за цих умов.

Введення вітаміну E шурам з моделлю хронічного алкоголізму призводить до нормалізації активності ПДК в ізольованих нервових закінченнях, що може свідчити про тимчасовість цих змін. Нездатність вітаміну E нормалізувати біологічну активність ТЗБ у складі ПМС може свідчити про серйозні порушення у структурі ПМС або ТЗБ в їхньому складі за умов хронічної дії алкоголю.

Ключові слова: тіамін, вітамін Е, алкоголізм, метаболізм, синаптосоми, тіамін-зв'язувальний білок.

**THIAMINE METABOLISM  
DISTURBANCES IN THE RAT BRAIN  
AT EXPERIMENTAL ALCOHOLISM  
AND A POSSIBILITY OF THEIR  
CORRECTION BY VITAMIN E**

*Yu. M. Parkhomenko, S. Yu. Pylypchuk,  
A. A. Sydorova, S. P. Stepanenko,  
L. I. Chekhovskaya, G. V. Donchenko*

Palladin Institute of Biochemistry, National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: yupark@biochem.kiev.ua

**S u m m a r y**

The influence of the chronic consumption of alcohol on biochemical reactions of thiamine metabolism in the rat brain is investigated. It is shown that the content of thiamine diphosphate (ThDP) in the brain tissue does not change at these conditions, though there is an essential decrease in the thiamine-kinase activity. The ability of the isolated nerve terminals (synaptosomes) to absorb labelled thiamine also decreases under this condition. The specified disturbances are probably the reason for deceleration of exchange of free (uncombined with proteins) thiamine and its phosphates in nervous cells, that results in the observed reduction in activity of pyruvate dehydrogenase complex (PDC) due to inactivation by phosphorylation.

Thiamine-binding and thiaminetriphosphatase activities of thiamine-binding protein (ThBP) in the structure of synaptic plasma membranes (SPM), isolated from the rat brain in various experimental groups, have been investigated. The increase, with respect to control, in the both enzymes activity in SPM, isolated from the brain of rats with chronic alcoholism has been shown. Kinetic researches testify to an increase of affinity of SPM (ThBP) for thiamine and thiaminetriphosphate in these conditions.

When vitamin E was given to animals with a model of chronic alcoholism the normalization of PDC activity in nervous cells was observed, that can testify to the transient character of these changes. Inability of vitamin E to normalize biological activities of ThBP in PMS, that has been analyzed, can testify to more deep disturbances in the structure of SPM or thiamine binding protein in their structure.

Key words: thiamine, vitamin E, alcoholism, metabolism, synaptosome, thiamine-binding protein.

1. *Carroll M. Leevy* // Annals New York Academy of Sciences. – 1982. – Part V. – P. 316–326.
2. *Heap L. C., Pratt O. E., Ward R. J. et al.* // Psychiatr Genet. – 2002. – 12(4). P. 217–24.
3. *Rindi G., Reggiani C., Patrini C. et al.* // Alcohol. Alcohol. – 1992. – P. 505–522.
4. *Ceccanti M., Mancinelli R., Sasso G. F. et al.* // Ibid. – 2005. – 40(4). – P. 283–290.
5. *Пархоменко Ю. М., Пилипчук С. Ю., Черныш И. Ю. и др.* / Мат. межд. симпозиума “Активные формы кислорода, азота и хлора в регуляции клеточных функций в норме и при патологии. – Гродно, Беларусь, 2006. – С. 50–55.
6. *Calabrese V., Scapagnini G., Latteri S. et al.* // Int. J. Tissue React. – 2002. – 24(3). – P. 97–104.
7. *Scapagnini G., Ravagna A., Bella R., Colombrita C. et al.* // Ibid. – P. 89–96.
8. *Штутман Ц. М., Бібер Г. О.* // Укр. біохім. журн. – 1974. – 46, № 2. – С. 192–196.
9. *Пархоменко Ю. М., Черныш И. Ю., Донченко Г. В.* // Вопр. питания. – 1992. – № 1. – С. 45–48.
10. *Пархоменко Ю. М., Донченко Г. В., Пилипчук С. Ю. и др.* // Укр. біохім. журн. – 2007. – 79, № 3. – С. 61–69.
11. *Протасова З. С., Пархоменко Ю. М., Донченко Г. В. и др.* // Там само. – 1999. – 71, № 4. – С. 50–57.
12. *Островский Ю. М. Экспериментальная витаминология* / Под ред. Ю. М. Островского. – Минск: Наука и техника, 1982. – 550 с.
13. *Пилипчук С. Ю., Пархоменко Ю. М., Протасова З. С. и др.* // Укр. біохім. журн. – 2001. – 73, № 2. – С. 51–57.
14. *Розанов В. А., Пархоменко Ю. М.* // Укр. биохим. журн. – 1987. – 59, № 1. – С. 29–33.
15. *Ellman G. L., Courtney K. D., Valerio A., Featherstone V. R. M.* // Biochem. Pharmacology. – 1961. – 7. – P. 88–95.
16. *Современные методы в биохимии* / Под ред. В. Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – 391 с.
17. *Кулинский В. И.* // Успехи биол. химии. – 1990. – № 30. – С. 157–180.
18. *Пархоменко Ю. М., Протасова З. С., Донченко Г. В.* // Укр. биохим журн. – 1996. – 68, № 2. – С. 3–15.
19. *Постоевко В. А., Пархоменко Ю. М., Халмуратов А. Г., Донченко Г. В.* // Биохимия. – 1987. – 52, № 11. – С. 1792–1797.



20. Пархоменко Ю. М., Протасова З. С., Янчий О. Р., Донченко Г. В. // Нейрофизиология. – 2001. – 33, № 3. – С. 161–165.
21. Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В. Кинетические методы в биохимических исследованиях. – Москва: Изд-во Московского университета, 1982. – 344 с.
22. Guerrini I., Thomson A. D., Cook C. C. et al. // Am. J. Med. Genet B Neuropsychiatr. Gen. – 2005. – 137(1). – P. 17–19.
23. Пархоменко Ю. М., Черныш И. Ю., Чурилова Т. Я., Халмурадов А. Г. // Укр. биохим. журн. – 1987. – 59, № 6. – С. 49–54.
24. Штутман Ц. М., Кузнецова Л. Н., Пархоменко Ю. М., Бибер А. А. Витамины. – К.: Наук. думка, 1975. – Вып. 8. – С. 96–105.

Отримано 13.09.2007