

## ОБМІН ТІАМІНУ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОГО АЛКОГОЛІЗМУ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЇ

**О. Павлова, С. Степаненко, Л. Чехівська, Ю. Пархоменко**

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України  
вул. Леонтовича, 9, Київ 01602, Україна  
e-mail: aspavlova92@gmail.com*

На тваринній моделі хронічного алкоголізму (вживання 15 % розчину етанолу самцями щурів упродовж дев'яти місяців) досліджено зміни у рівні тіамінірофосфокінази (ТПК) у кількох відділах головного мозку: корі великих півкуль, мозочку та гіпокампі методом імуноблотингу. Також визначено зміни у активності тіамінірофосфокінази, рівні активних форм кисню та сульфгідрильних груп у гомогенаті мозку. Перевірена можливість корекції патологічного стану за відновленням вищеозначених показників, введенням високих доз тіаміну та метовітану у кількості 2 мг/кг живої ваги. Виявлено зниження показників обміну тіаміну за умов вживання алкоголю та підвищення оксидативного стресу. Продемонстровано неоднорідну реакцію досліджуваних відділів головного мозку тварин на корекцію окремо тіаміном або препаратом Метовітан, але сумісне введення високих доз тіаміну та препарату Метовітан щурам, що вживали алкоголь, покращує стан і відновлює рівень усіх досліджуваних показників як по відділах, так і в загальному гомогенаті мозку.

*Ключові слова:* алкоголізм, тіамін, тіамінірофосфокіназа, Метовітан.

Алкогольна енцефалопатія є однією з найпоширеніших нейродегенеративних патологій [5]. Дефіцит вітаміну В<sub>1</sub> при довготривалому вживанні алкоголю є добре встановленим фактом і вважається однією з причин розвитку нейродегенеративного захворювання у людей, які страждають на хронічний алкоголізм, – синдрому Верніке-Корсакова [6, 9, 11]. Цей нейропсихіатричний синдром характеризується атаксією, офтальмоплегією, запамороченням свідомості, комою. Групу ризику становлять алкоголіки, які страждають також на захворювання, що призводять до погіршення засвоєння їжі: хвороби шлунково-кишкового тракту [12], нестримне блювання вагітних [13], злоякісні утворення, СНІД [4]. Синдром Верніке-Корсакова характеризується пошкодженнями в перивентрикулярних відділах проміжного мозку, стовбура мозку, верхній частині черв'яка мозочку, таламусі, соскоподібному тілі, вестибулярному ядрі й оліві довгастого мозку [6, 7, 14]. Дані щодо впливу етанолу на біохімічні процеси, які беруть участь в обміні та функціонуванні тіаміну в нервових клітинах, доволі обмежені. Експериментально встановлено, що під впливом хронічного споживання алкоголю знижується активність тіамінірофосфокінази (ТПК), ензиму, який здійснює фосфорилування тіаміну, що потрапляє до клітини, з утворенням його коферментної форми – ТДФ [15, 2]. Зниження утворення ТДФ за хронічного алкоголізму підтверджується помітним зниженням активності ПДК, ОГДК і транскетолази в мозку хворих з діагнозом синдрому Верніке-Корсакова, що, у свою чергу, призводить до роз'єднання функції мітохондрій у нервових клітинах та окислювального стресу [8]. Враховуючи вищеозначене, метою нашої роботи було встановити, як саме змінюється рівень ТПК у різних відділах мозку (кора великих півкуль, гіпокамп і мозочок) щурів за тривалого споживання етанолу, та чи можна скорегувати патологічний стан введенням високих доз тіаміну і Метовітану.

### Матеріали і методи

Усі експерименти на тваринах були виконані відповідно до «Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин», затверджених Комісією з догляду, утримання та використання експериментальних тварин Інституту біохімії ім. Палладіна НАН України. Для відтворення моделі хронічного алкоголізму на щурах тваринам упродовж 9 місяців давали 15 % розчин етанолу, в той час як контрольна група вживала чисту воду. За добу до декапітації тварин було поділено на чотири групи: алкогольна (15 %), з введенням тіаміну в кількості 2 мг/кг ваги (15 %+Т), з введенням Метовітану в кількості 2 мг/кг ваги (15 %+М) та з введенням обох у кількості 2 мг/кг ваги (15 %+Т+М). Після декапітації вилучали мозок і поміщали його на лід. Для проведення імуноблотингу відбирали тканину масою 100 мг з трьох відділів мозку: кори великих півкуль, мозочка та гіпокампа. Тканину гомогенізували в 50 mM тріс-НСІ буфері (рН 8,0), який додатково містив 0,1 % SDS і коктейль інгібіторів протеаз. Співвідношення тканина:буфер становило 1:10. Решту мозку гомогенізували в 50 mM тріс – НСІ, що містив 0,32 M сахарозу з додаванням РМSФ, рН 7,4 і використовували в подальшому для визначення вказаних нижче біохімічних показників. Гомогенати центрифугували за охолодження 16 000 g. Активність ТРК визначали методом, що описаний раніше [3]. Принцип методу полягає у визначенні кількості утвореного ТDP після інкубації тіаміну з препаратом ТПК (гомогенатом тканини). Внутрішньоклітинний рівень активних форм кисню (АФК) визначали за допомогою специфічного молекулярного реагента – 2',7'-дихлорофлуоресцин діацетату (H<sub>2</sub>DCF-DA) («Sigma», США) [1]. Інтенсивність флуоресценції вимірювали на спектрофлуориметрі (Perkin-elmer LS-50), довжина хвилі збудження і емісії 497 та 525 нм відповідно, щільність – 2,5-5,0 нм. Визначення концентрації SH-груп проводили за допомогою реактиву Еллмана, відповідно до описаного раніше методу [1]. Вміст протеїну визначали за методом Лоурі та спектрофотометрично при 280 нм [1]. Експериментальні дані обробляли статистичними методами з використанням критерію t Стьюдента. Розраховували значення середніх арифметичних (М) і їхніх середніх квадратичних похибок (m). Значення p < 0,05 вважали достовірним. Задля розрахунків та графічної презентації отриманих результатів була використана комп'ютерна програма MS Office Excel 2007 і Origin Pro 8.6. Протеїни розділяли електрофорезом у 10 % поліакриламідному гелі (ПААГ) у денатуруючих умовах з 0,1 % SDS за методом Laemmli [10]. Для електропереносу протеїнів використовували нітроцелюлозну мембрану. Сайти неспецифічної сорбції блокували в PBS, який містив 5 % сухого молока («Sigma», США) та 0,1 % Tween-20. Далі мембрану промивали PBST, інкубували з первинними антитілами (anti-ТРК1 «Abcam», monoclonal, США) упродовж 16 годин за +4 °С. Неспецифічно зв'язані антитіла видаляли промиванням з PBST, після чого інкубували з вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому («Sigma», США, anti-rabbit, № 9169). Після відмивання імуореактивні зони візуалізували за допомогою набору ECL, результат фіксували на рентгенівську плівку.

### Результати і їхнє обговорення

#### *Зміни активності ТПК*

У щурів, що вживали алкоголь, спостерігалось зниження активності ТПК у 1,6 разу щодо контрольної групи. За введення тіаміну не відбулося відновлення показника, однак у групі з корекцією Метовітаном активність ТПК майже досягала рівня контролю. Несподівано сумісне введення препаратів призвело до різкого зростання активності, більш ніж удвічі щодо алкогольної групи (рис. 1).

#### *Вміст АФК*

За хронічного вживання алкоголю вміст АФК збільшувався щодо контролю в 1,3 разу. Введення Метовітану та комбінації Метовітану з тіаміном нормалізувало показник, тоді як сам по собі тіамін не мав такої дії (рис. 2).

*Кількість SH-груп*

За хронічного вживання алкоголю вміст SH-груп зменшувався на 25 % від рівня контролю. Введення тіаміну та комбінації Метовітану з тіаміном нормалізувало показник, тоді як у групі, якій було введено Метовітан, вміст сульфгідрильних груп зростав удвічі щодо контролю (рис. 3).

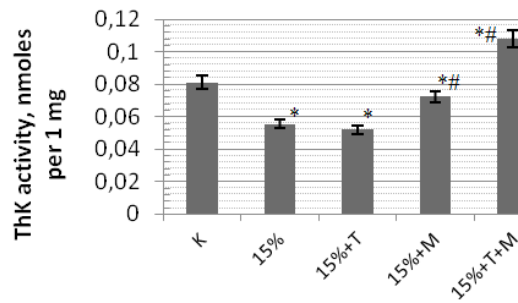


Рис. 1. Зміни активності ТПК: \* –  $p < 0,05$  щодо контрольної групи; # –  $p < 0,05$  щодо алкогольної групи

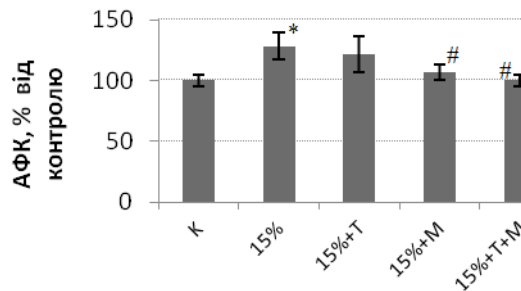


Рис. 2. Вміст АФК: \* –  $p < 0,05$  щодо контрольної групи; # –  $p < 0,05$  щодо алкогольної групи

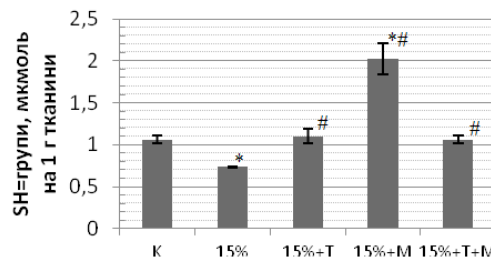


Рис. 3. Зміни SH-груп: \* –  $p < 0,05$  щодо контрольної групи; # –  $p < 0,05$  щодо алкогольної групи

*Вміст ТРК у відділах головного мозку*

За результатами імуноблотингу (рис. 4) було виявлено, що за хронічного алкоголізму відбувається зниження рівня ТПК у всіх трьох досліджуваних відділах (корі великих півкуль, гіпокампі та мозочку) на 20-25 % щодо контрольної групи. На корекцію відділи відреагували по-різному: введення самого лише тіаміну сприяло відновленню вмісту ТПК у корі до контрольного рівня, та зростання показника у мозочку. Однак у гіпокампі тіамін не мав жодного ефекту. Корегування Метовітаном призводило до зростання рівня ферменту в усіх відділах, найбільш виразно у мозочку – більш ніж удвічі порівняно з групою без корекції. Комбіноване введення тіаміну та Метовітану відновлювало до контрольного рівня ТПК у корі та значно підвищувало його у мозочку і гіпокампі (в обох відділах у 1,4 разу щодо контролю) (рис. 5).

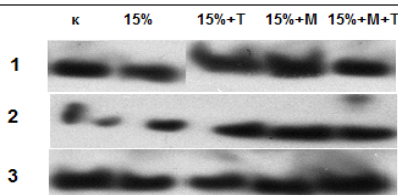
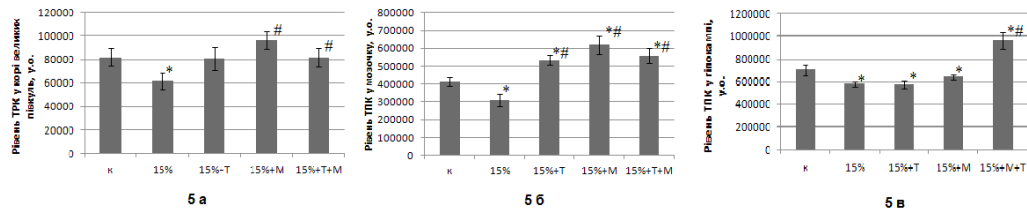


Рис. 4. Блотограми ТПК у відділах головного мозку: 1 – кора великих півкуль; 2 – мозочок; 3 – гіпокамп

Рис. 5. Вміст ТПК у відділах головного мозку: кора (5а), мозочок (5б), гіпокамп (5в); \* –  $p < 0,05$  щодо контрольної групи; # –  $p < 0,05$  щодо алкогольної групи

### Висновки

За умов хронічного алкоголізму обмін тіаміну сповільнюється, а його показники знижуються порівняно з контрольною групою, та відбувається оксидативний стрес, що відображається на підвищенні вмісту АФК. Скорегувати патологічний стан введенням високих доз тіаміну не є можливим. Вочевидь, препарат Метовітан активує обмін і підсилює всі процеси метаболізму тіаміну, однак не відновлює редокс-стану нервової тканини. Найбільш виразну нормалізуючу дію має комбінація вищезначених препаратів, що майже повністю відновлює досліджувані параметри до контрольного рівня.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Северин С. Е., Соловьева Г. А. Практикум по биохимии. М.: МГУ, 1989.
- Seccanti M., Mancinelli R., Sasso G. F., et al. Erythrocyte thiamine (Th) esters: a major factor of the alcohol withdrawal syndrome or a candidate marker for alcoholism itself? // Alcohol Alcohol. 2005. Vol. 40. P. 283–290.
- Bergmeyer H. U. X. Methoden der enzymatischen Analyse. 3<sup>a</sup> ed. tomo II. Verlag Chemie, 1974.
- Butterworth R. F., Gaudreau C., Vincellette J. et al. Thiamine deficiency and Wernicke's encephalopathy in AIDS // Metab. Brain Dis. 1991. Vol. 6. P. 207–212.
- Butterworth R. F., Kril J. J., Harper C. G. Thiamine-dependent enzyme changes in the brains of alcoholics: relationship to the Wernicke-Korsakoff syndrome // Alcohol. Clin. Exp. Res. 1993. Vol. 17. No. 5. P. 1084–1088.
- Harper C. The neuropathology of alcohol-related brain damage // Alcohol. 2009. Vol. 44. P. 136–140.
- Harper C. The neurotoxicity of alcohol // Hum. Exp. Toxicol. 2007. Vol. 26. P. 251–257.
- Hazell A. S. Update of cell damage mechanisms in thiamine deficiency: focus on oxidative stress, excitotoxicity and inflammation // Alcohol Alcohol. 2009. Vol. 44. P. 141–147.
- Heap L. C., Pratt O. E., Ward R. J. Individual susceptibility to Wernicke-Korsakoff syndrome and alcoholism-induced cognitive deficit: impaired thiamine utilization found in alcoholics and alcohol abusers // Psychiatr. Genet. 2002. Vol. 12. P. 217–224.
- Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // Nature. 1970. Vol. 227. No. 15. P. 680–685.
- Levy C. M. Thiamin deficiency and alcoholism // Acad. Sci. 1982. Vol. 378. P. 316–326.
- Lindboe C. F. Wernicke's encephalopathy in non-alcoholics. An autopsy study // J. Neurol. Sci. 1989. Vol. 90. P. 125–129.

13. *Ohkoshi N.* Wernicke's encephalopathy induced by hyperemesis gravidarum, associated with bilateral caudate lesions on computed tomography and magnetic resonance imaging// *Eur. Neurol.* 1994. Vol. 34. P. 177-180.
14. *Thomson A. D., Cook C. C., Guerrini I. et al.* Wernicke's encephalopathy: 'Plus ca change, plus c'est la meme chose'// *Alcohol Alcohol.* 2008. Vol. 43.P. 180–186.
15. *Rindi G., Reggiani C., Patrini C. et al.* Effect of ethanol on the in vivo kinetics of thiamine phosphorylation and dephosphorylation in different organs of rat--II. Acute effects// *Alcohol Alcohol.* 1992. Vol. 27. P. 505–522.

Стаття: надійшла до редакції 25.07.16  
доопрацьована 26.08.16  
прийнята до друку 30.08.16

### ОБМЕН ТИАМИНА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ АЛКОГОЛИЗМЕ И ЕГО КОРРЕКЦИИ

**А. Павлова, С. Степаненко, Л. Чеховская, Ю. Пархоменко**

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины  
ул. Леонтовича, 9, Киев 01601, Украина  
mail: aspavlova92@gmail.com*

На животной модели хронического алкоголизма (употребление 15 % раствора этанола самцами крыс на протяжении девяти месяцев) исследованы изменения в уровне тиаминпирофосфокиназы (ТПК) в нескольких отделах головного мозга: коре больших полушарий, мозжечке и гиппокампе методом иммуноблотинга. Так же определены изменения в активности тиаминпирофосфокиназы, уровне активных форм кислорода и сульфгидрильных групп в гомогенате мозга. Проверена возможность коррекции патологического состояния введением высоких доз тиамин и препарата Метовитан в количестве 2 мг/кг живого веса. Выявлено снижение показателей обмена тиамин при употреблении алкоголя и повышение оксидативного стресса. Продемонстрирована неоднородная реакция исследуемых отделов головного мозга на коррекцию по отдельности тиамин или препаратом Метовитан, но совместное введение тиамин и препарата Метовитан крысам, которые употребляли алкоголь, улучшает состояние и восстанавливает уровень всех исследуемых показателей как по отделам, так и в общем гомогенате мозга.

*Ключевые слова:* алкоголизм, тиамин, тиаминпирофосфокиназа, Метовитан

### THIAMINE EXCHANGE AT CHRONIC ALCOHOLISM CONDITION AND ITS CORRECTION

**O. Pavlova, S. Stepanenko, L. Chehovska, Yu. Parkhomenko**

*Palladin's Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine  
9, Leontovych St., Kyiv 01601, Ukraine  
e-mail: aspavlova92@gmail.com*

Thiaminpirophosphokinase (TPK) level in several brain departments: cortex, cerebellum and hippocampus, and TPK activity, ROS and SH-groups levels changes in whole brain extract were examined at the chronic alcoholism animal model (nine month of 15 % ethanol solution consumption by rats males). The pathologic condition correction with thiamine and Methovitan high doses administration in 2mg/kg amount opportunity was checked. Thiamine exchange markers reduction and oxidative stress increase at alcohol consumption revealed. It is shown, that departments reacts differently at separate thiamine or Methovitan administration, same time thiamine and Methovitan coadministration improves condition and restores studied parameters level as by departments, as whole brain extract.

*Keywords:* alcoholism, thiamin, thiaminpirophosphokinase, Methovitan.