

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О. В. ПАЛЛАДИНА**

**ПАВЛОВА ОЛЕКСАНДРА СЕРГІЇВНА**

УДК 577.164.1:576.311.348.4

**КЛЮЧОВІ ПРОТЕЇНИ ОБМІНУ ТІАМІНУ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ  
СТАН НЕРВОВИХ КЛІТИН ЗА РІЗНОЇ ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ  
ОРГАНІЗМУ ВІТАМІНОМ В<sub>1</sub>**

03.00.04 – біохімія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук  
**Пархоменко Юлія Михайлівна,**  
провідний науковий співробітник  
відділу біохімії вітамінів і коензимів  
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна  
НАН України

**Офіційні опоненти:** доктор хімічних наук, професор,  
чл.-кор. НАН України  
**Вовк Андрій Іванович,**  
завідувач відділу механізмів  
біоорганічних реакцій  
Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії  
ім. В.П. Кухаря НАН України

доктор біологічних наук,  
**Дворщенко Катерина Олександрівна,**  
старший науковий співробітник,  
завідувач НДЛ «Біохімії» ННУ  
інституту біології та медицини  
Київського Національного Університету  
ім. Тараса Шевченка.

Захист відбудеться “25” листопада 2019 року о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: 01030, Київ, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (01030, Київ, вул. Леонтовича, 9).

Автореферат розісланий “\_\_” жовтня 2019 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
кандидат біологічних наук



Н.П. Карлова

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Через століття після відкриття вітаміну В<sub>1</sub> (тіаміну), все ще не існує повного розуміння надзвичайно високої чутливості нервових клітин до дефіциту цього вітаміну (*Parkhomenko et al., 2016*). Між тим, накопичені дані літератури переконливо свідчать про те, що майже всі відомі нейродегенеративні патології супроводжуються тією чи іншою мірою вираженою нестачею тіаміну (*Haas, 1988; Mouton-Liger et al., 2015*), а для розвитку деяких з цих патологій дефіцит тіаміну або порушення його обміну може бути ініціюючим фактором (*Gibson et al., 2016; Pan et al., 2016; Rao et al., 1993*). Останнім часом з'являються дані, які свідчать про те, що тривале введення високих доз тіаміну запобігає нейродегенеративним змінам в клітинах мозку при захворюваннях, спричинених генетичними вадами (*Suzuki et al., 2018; Costantini et al., 2016*).

Неможливість пояснити високу нейроактивність вітаміну В<sub>1</sub> лише з позиції коензимної ролі біологічно активної похідної тіаміну – тіаміндифосфату (ТДФ) – ініціювала пошуки «некоензимних» механізмів участі тіаміну у життєдіяльності клітин (*Ostrovsky, 1968*). Аналіз даних літератури та результатів власних досліджень дозволили зробити припущення, що не існування якихось ще невідомих тіамін-залежних біохімічних реакцій в нервових клітинах, а саме особливості структурно-функціональної організації останніх лежать в основі високої чутливості нервових клітин до дефіциту тіаміну. В цьому аспекті цікавим є той факт, що кілька груп дослідників, незалежно одна від одної, постулювали наявність в нервових клітинах спеціального пулу тіаміну та його похідних (*Berman & Fishman, 1975; Bettendorff, 1996; Пархоменко и др., 1996*). Згідно припущення авторів, циркуляція цього пулу між внутрішньоклітинним простором і пресинаптичною щільною пов'язана із функціональним станом збудливої мембрани і взагалі з функціонуванням нервових клітин. Вищевказану гіпотезу підтримують спостереження, які свідчать, що за умов дефіциту тіаміну в організмі коливання вмісту ТДФ в клітинах мозку в межах постійних рівнів забезпечується перманентним перекачуванням вітаміну в мозок з інших органів (кров, печінка, нирки тощо) і тільки після зниження кількості тіаміну в інших органах починаються зміни його обміну в клітинах мозку (*Туманов, Требухина, 1987*). Вищенаведені факти вказують на те, що відповідь щодо молекулярних механізмів високої нейроактивності вітаміну В<sub>1</sub> слід шукати у взаємодії його біологічно активних похідних, а також, ймовірно, протеїнів його обміну зі структурними протеїнами, які забезпечують динамічність клітин, насамперед, протеїнами цитоскелету.

Ще одне питання, що широко дискутується в літературі – це взаємозв'язок між дефіцитом тіаміну, оксидативним стресом і розвитком нейродегенеративних процесів (*Gibson and Zhang, 2002; Liu et al., 2017; Chauhan et al., 2018*). Основне питання стосується того, що саме, чи виключно дефіцит тіаміну чи окиснювальний стрес, спричинений нестачею цього вітаміну (через дефіцит

ТДФ), може викликати нейродегенерацію. Відповідь на це питання ускладнюється тим, що тіамін та його похідні здатні брати участь у реакціях окиснення-відновлення. Це було продемонстровано в модельних умовах (Stepuro *et al.*, 2012) та виявлено, що тіолізована молекула тіаміну здатна взаємодіяти з амінокислотним залишком тирозину (що входить до структури майже всіх клітинних протеїнів), і це приводить до утворення дитиросильних фрагментів (як наслідок – зшивка і полімеризація пептидів) і дисульфїду тіаміну.

Все це свідчить про те, що з'ясування вкладу тіамінзалежних процесів у підтримання життєздатності нервових клітин є актуальним питанням в процесі визначення шляхів профілактики нейродегенеративних захворювань та їх лікування. І одним з ефективних методичним підходів до розуміння механізмів дегенеративних змін у нервовій системі є виявлення протеїнів, що є чутливими до зміни рівня забезпеченості організму вітаміном В<sub>1</sub>, серед яких можуть бути як протеїни обміну тіаміну, так і протеїни цитоскелету в нервових клітинах.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами лабораторії.** Робота виконувалась у 2014-2017 рр. в рамках наукових тем відділу біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України: 1) «Роль вітамінів А, Е, В<sub>1</sub>, РР, D<sub>3</sub>, убіхінону та їх коензимів у забезпеченні функціонування спеціалізованих клітин за норми та за умов ініціації їх загибелі» (2012-2016 рр., тема № 4, державний реєстраційний номер 0112U002625), розділ 3 «Вивчення механізмів регуляції обміну та функціонування вітаміну В<sub>1</sub> та його похідних в нервових клітинах за нейродегенеративних патологій». 2) «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» (2012-2016 рр., тема № 15, державний реєстраційний номер 0112U002624), підрозділ 2 «Взаємодія систем регуляції вітамінами та коензимами внутрішньоклітинного метаболізму; вивчення фундаментальних основ процесів функціонування біологічних систем і регуляції вітамінами Е, В<sub>1</sub>, РР, коензимами та їх біологічно активними похідними внутрішньоклітинного метаболізму в нормі та за патології». Роботу було підтримано також програмою "FEBS Collaborative Experimental Scholarships for Central & Eastern Europe" (2017 р.) та стипендією за результатами конкурсу на кращу наукову роботу Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (2015 та 2016 рр.).

**Мета і завдання дослідження.** Метою дисертаційної роботи було оцінити наявність та характер змін протеїнів нервових клітин, які беруть участь у транспортуванні тіаміну через плазматичну мембрану і синтезі ТДФ в клітині, та окремих нейроспецифічних протеїнів цитоскелету за різної забезпеченості організму тіаміном.

Відповідно до мети були поставлені наступні завдання.

1. Охарактеризувати моделі дефіциту тіаміну на тваринах за загальними показниками окисно-відновного стану (рівень АФК та SH-груп), вмістом тіаміну у печінці та ТДФ у мозку.

2. За умов дефіциту тіаміну різної етіології (аліментарний авітаміноз та гіповітаміноз, хронічний алкоголізм) дослідити вміст транспортера тіаміну (THTR-1) та експресію його гену у трьох відділах мозку: корі, мозочку, гіпокампі.
3. Оцінити зворотність виявлених змін у вмісті протеїну та експресії гену транспортера тіаміну за умов дефіциту тіаміну різної етіології шляхом одноразового введення високої дози тіаміну.
4. Дослідити активність, вміст протеїну, експресію мРНК тіамініпрофосфокінази (ензиму, відповідального за синтез ТДФ), за умов дефіциту тіаміну різної етіології у корі великих півкуль, мозочку та гіпокампі щурів.
5. Оцінити зворотність виявлених змін у стані тіамініпрофосфокінази (ТПК) за умов дефіциту тіаміну різної етіології одноразовим введенням високої дози тіаміну.
6. Дослідити вплив забезпеченості клітин тіаміном на стан окремих нейроспецифічних протеїнів цитоскелету астроглії та нейронів у трьох відділах мозку: корі, мозочку, гіпокампі.

**Об'єкт дослідження:** протеїни метаболізму тіаміну нервової тканини, а саме, транспортер тіаміну і тіамініпрофосфокіназа, та нейроспецифічні протеїни цитоскелету.

**Предмет дослідження:** Дефіцит тіаміну як ініціюючий фактор у механізмах розвитку нейродегенерації, гліальний фібрилярний кислий протеїн та триплет нейрофіламентів як динамічні структури нервових клітин, які є чутливими до нестачі тіаміну.

**Методи дослідження.** У роботі були використані наступні методи: біохімічні (спектрофотометрія, флюорометрія) для оцінки загального вмісту протеїну, тіаміну у печінці, вмісту ТДФ та активності ТПК у мозку та оцінки параметрів окисно-відновного стану нервових клітин; імунохімічні (вестерн-блот аналіз, імуноцито- та імуногістохімія) для оцінки вмісту протеїнів обміну тіаміну та нейроспецифічних протеїнів цитоскелету; методи молекулярної біології (полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі) для визначення рівня експресії цільових генів; конфокальна мікроскопія для встановлення локалізації цільових протеїнів; методи математичної статистики для обробки та аналізу результатів досліджень за допомогою комп'ютерних програм MS Excel та Origin.

#### **Наукова новизна одержаних результатів.**

Вперше проведено комплексне дослідження змін у протеїнах, від яких залежить швидкість синтезу ТДФ у нервових клітинах, а саме, транспортера тіаміну (THTR-1) і тіамініпрофосфокінази (ТПК) за умов дефіциту тіаміну (ТД) різної етіології. Виявлено протилежно спрямовані зміни вмісту цих двох протеїнів та експресії їх генів за умов  $V_1$  гіпо- та авітамінозу. А саме, спостерігається підвищення вмісту THTR-1 та експресії гену *slc19A2* у всіх відділах мозку, що досліджувались, у відповідь на аліментарний авітаміноз. За цих же умов відбувається суттєве пригнічення функціональності ТПК: знижується активність ензиму у мозку, а також вміст ензиму і його мРНК у різних відділах мозку (корі великих півкуль, гіпокампі та мозочку). У випадку

моделі хронічного алкоголізму, яка також є визнаною моделлю дефіциту тіаміну, спостерігається зниження у визначених параметрах обох протеїнів у всіх трьох досліджених відділах мозку. Ці результати свідчать про іншу, ніж за умов авітамінозу, етіологію виникнення дефіциту тіаміну при хронічному вживанні алкоголю.

Порівняльне дослідження окисно-відновного стану в тканині мозку за умов В<sub>1</sub>-авітамінозу і В<sub>1</sub>-гіповітамінозу продемонструвало, що режим надходження тіаміну до клітин мозку є важливим для їх метаболізму. Обмежене, але постійне надходження тіаміну попереджає розвиток ознак окисдативного стресу, що демонструє можливість прямої взаємодії молекули тіаміну з вільними радикалами за фізіологічних умов. Повне або часткове відновлення змін у протеїнах, що досліджуються, при одноразовому введенні високої дози тіаміну спостерігається лише за умов відсутності в тканині мозку ознак окислювального стресу (ОС). Результати, отримані на моделі В<sub>1</sub>-авітамінозу свідчать, що порушення Red-Ox балансу у бік розвитку ОС може спричиняти гальмування біосинтезу ТПК на етапі трансляції цього протеїну. Вміст та активність ТПК частково відновлюється одноразовим введенням високої дози тіаміну. Встановлено, що за умов ТД відбувається збільшення асоціації ТПК з плазматичною мембраною, що може бути наслідком змін в клітинних структурах. Введення високої дози тіаміну до ТД клітин приводить до рівномірного перерозподілу ензиму у клітині.

Продемонстровано підвищену чутливість астроцитів до ТД різного ступеня – навіть за умов обмеженого надходження тіаміну спостерігається зниження вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) який є маркером функціонального стану астроцитів. Вперше продемонстровано, що ці зміни обумовлені дефіцитом тіаміну, про що свідчить їх зворотність при одноразовому введенні вітаміну. Зміни в рівні триплету нейрофіламентів (NF) спостерігаються тільки за умов глибокого аліментарного авітамінозу, і тільки у мозочку. При введенні тіаміну у першу чергу відновлюється рівень триплету, тоді як вміст астроцитарного маркеру підвищується лише частково, що свідчить про пріоритетність нейронів при розподілі тіаміну у головному мозку.

**Практичне значення роботи.** Завдяки виявленій зворотності патологічних змін введенням високих доз тіаміну та/або препарату «Метовітан» обґрунтовано доцільність створення на основі препарату «Метовітан» нового його варіанту, збагаченого тіаміном. Продемонстрована відновлювальність нейроспецифічних структур цитоскелету, пригнічених за умов ТД станів, є підставою для науково обґрунтованих практичних рекомендацій щодо доцільності використання запропонованої нами комбінації препаратів (висока доза тіаміну та препарат «Метовітан») для профілактики та/або лікування нейродегенеративних патологій, які індукуються або супроводжуються дефіцитом тіаміну.

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачем самостійно здійснено пошук та аналіз сучасних джерел літератури відповідно до теми дисертаційної роботи, здійснено підбір та опрацювання молекулярно-біологічних та біохімічних

методів дослідження, виконано експериментальну частину роботи протягом 2014-2017 рр. Планування та розробка загальної концепції роботи, формулювання основних положень і висновків дисертаційної роботи, підготовка до друку наукових публікацій проводились спільно з науковим керівником д.б.н. Пархоменко Ю.М. Автор висловлює глибоку вдячність колегам за допомогу в проведенні досліджень, співучасть яких у виконанні роботи відмічена у спільних публікаціях.

**Апробація матеріалів дисертації.** Основні наукові положення дисертаційної роботи були представлені у вигляді усних та постерних доповідей на конференціях: The 8th International Conference on thiamine: From catalase to pathology, 2014.- Liege, Belgium; конференція – конкурс молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2015»- Київ, Україна; «Актуальные проблемы современной биохимии и клеточной биологии», 24-25 сентября 2015 г., Днепропетровск; X parnas conference young scientist forum “Molecules in the living cell and innovative medicine»; конференція – конкурс молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2019»- Київ, Україна; XII Український біохімічний конгрес, 30 вересня-4 жовтня 2019, Тернопіль, Україна.

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 7 статей у наукових фахових журналах, та 6 тез доповідей у збірниках матеріалів міжнародних та вітчизняних наукових конгресів, конференцій та з'їздів.

**Структура і обсяг дисертації.** Дисертація містить такі розділи: анотація, вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати та обговорення досліджень, узагальнення результатів досліджень, висновки та список використаних джерел (250 найменувань). Дисертацію викладено на 142 сторінках друкованого тексту, загальна кількість ілюстрацій – 2 таблиці та 34 рисунки.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Огляд літератури.** Представлено сучасні дані щодо основних біохімічних та молекулярних механізмів участі тіаміну у функціонуванні нервових клітин за норми та порушенні тіамін-залежних процесів за умов розвитку тіамін-дефіцитних станів та нейродегенеративних патологій. Висвітлено сучасні уявлення щодо молекулярних механізмів дії вітаміну В<sub>1</sub> та проаналізовано роль тіаміну у розвитку процесів нейродегенерації.

**Матеріали та методи досліджень.** Дослідження проводили на білих щурах (самці лінії Wistar масою 80±10 г та 120±10 г у випадку моделі хронічного споживання алкоголю). У кожній моделі тварин було поділено на 3 групи : 1 – контрольна група, 2 – тварини експериментальної групи (які утримувались або на безтіаміновій дієті, або отримували щодня 20% від добової норми тіаміну, або вживали 15% розчин етанолу як єдине джерело рідини) та 3 – тварини з експериментальної групи яким за добу до закінчення експерименту вводили тіамін або препарат Метовітан (метионін - 97%, токоферол - 2,5%, тіамін - 0,3%, нікотінамід - 0,22%, цинк - 0,01%,

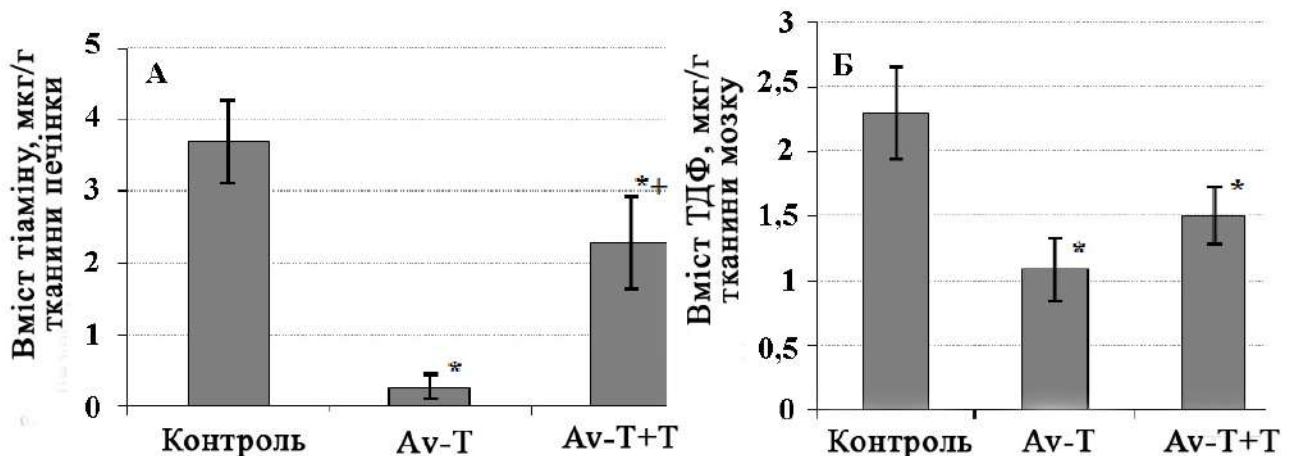
виробництво - «Технолог», Україна). у кількості 2 мг/кг ваги або комбінацію цих препаратів. Усі маніпуляції з дослідними тваринами проводили з дотриманням загальноприйнятих біоетичних норм гуманного поводження з лабораторними тваринами у відповідності до міжнародних та національних положень: «Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986); «Загальні етичні принципи проведення експериментів на тваринах» (Україна, 2001 р.), Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV (Україна, 2006). Для дослідження використовували тканину печінки та головного мозку і окремо тканини відділів мозку: кори великих півкуль, мозочку та гіпокампу. Вміст протеїну визначали за методом (Lowry *et al.*, 1951) та спектрофотометрично при 280 нм (Abdelhameed *et al.*, 2017; Severin SE, 1989). Оцінка вмісту тіаміну в тканині печінці проводилась з використанням відомої тіохромної методики (Островский, 1979). Внутрішньоклітинний рівень активних форм кисню (АФК) оцінювали специфічним молекулярним реагентом, 2'7'-дихлорфлуоресцеїну діацетату (H<sub>2</sub>DCF-DA, Sigma, США) (Zhang *et al.*, 2008). Концентрацію груп-SH оцінювали реактивом Еллмана згідно з методикою, описаною раніше (Pavlova *et al.*, 2016). Принцип оцінки активності ТПК базувався на вимірюванні вмісту ТДФ, що утворився після інкубації тіаміну з препаратом, що містить ТПК (у нашому випадку, з гомогенатами тканин). Вміст ТДФ оцінювався за допомогою експрес методу з використанням апоензиму апопіруват-декарбоксилази дріжджів (aroPDC). Ензиматична оцінка ТДФ базувалась на рекомбінації останнього як коензиму з aroPDC та на реакції з алкогольдегідрогеназою в присутності надлишку пірувату. Реакція оцінювалась за окисненням NADH. Кількість утвореного ТДФ розраховували з використанням ТДФ-стандарту. Для дослідження вмісту ТПК, THTR-1, GFAP та триплету нейрофіламентів у відділах головного мозку використовували метод імуноблотингу. Електрофоретичне розділення протеїнів проводили у буферній системі Лемлі з використанням 10-15% розділяючого поліакриламідного гелю. Після електроперенесення протеїнів мембрану інкубували з відповідними первинними антитілами у попередньо підібраних оптимальних концентраціях (моноклональні анти-TPK1, Abcam, США, моноклональні anti-NF, Sigma, США, поліклональні анти-THTR1, Sigma, США) та поліклональні анти-GFAP (Santa Cruz Biotech, США) антиламін В1(Sigma, США). Імунореактивні сигнали виявляли використовуючи реагенти для посиленої хемілюмінесценції (люмінол, кумарова кислота та пероксид водню, Sigma, США). Блоти GFAP було проявлено з використанням системи діамінобензидин + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Визначення вмісту мРНК ТПК та THTR1 проводили методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції (RT-qPCR), попередньо виділили тотальну РНК зі зразків відділів головного мозку з використанням Trizol RNA Prep kit (NEOGENE, Україна). Специфічні послідовності праймерів генерували за допомогою програмного забезпечення Primer BLAST. Зворотню ПЛР проводили з використанням ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit (Biolabs, New England) за протоколом виробника. У якості референсного гену



використовували гіпоксантин-гуанінфосфорибозилтрансферазу (HPRT). Обрахунок результатів проводили за допомогою  $\Delta\Delta C_1$  методу. Для проведення імуноцитохімічного дослідження GFAP-позитивних клітин парафінові секції депарафінували в ксилолі. Для вилучення антигену секції нагрівали в мікрохвильовій печі в 25 мМ тріс-НСІ-буфері, (рН 7,4; містить 5 мМ ЕДТА та 0,25% тритону X-100), протягом 1 хв при 600 Вт. Секції інкубували з первинними анти-GFAP-антитілами (1: 100). Ядра контрастували Hoechst 33258. Для контролю неспецифічного зв'язування зрізи інкубували без первинних антитіл. Візуалізація відбувалася методом конфокальної лазерної скануючої флуоресцентної мікроскопії. Зображення обробляли з використанням програмного забезпечення Zeiss ZEN 2009 Light Edition. Кількісний аналіз забарвлення GFAP проводили з використанням програмного забезпечення ImageJ 1.47h. та розраховували як відношення зеленого флуоресцентного сигналу (GFAP) до синього флуоресцентного сигналу ядер (G / B). Статистичну обробку експериментальних даних проводили у Microsoft Excel загальноприйнятими методами варіаційної статистики з вирахуванням середнього арифметичного значення показника (M) та стандартної похибки середнього значення ( $\pm m$ ). Визначення достовірності відмінностей між одержаними величинами двох вибірок проводили за t-критерієм Стьюдента. Вірогідність розходження між групами порівняння визначали методом однофакторного дисперсійного аналізу (one-way Anova) за допомогою Origin v.9.0. Достовірними вважали відмінності між групами при  $p < 0,05$ .

### Результати досліджень та їх обговорення

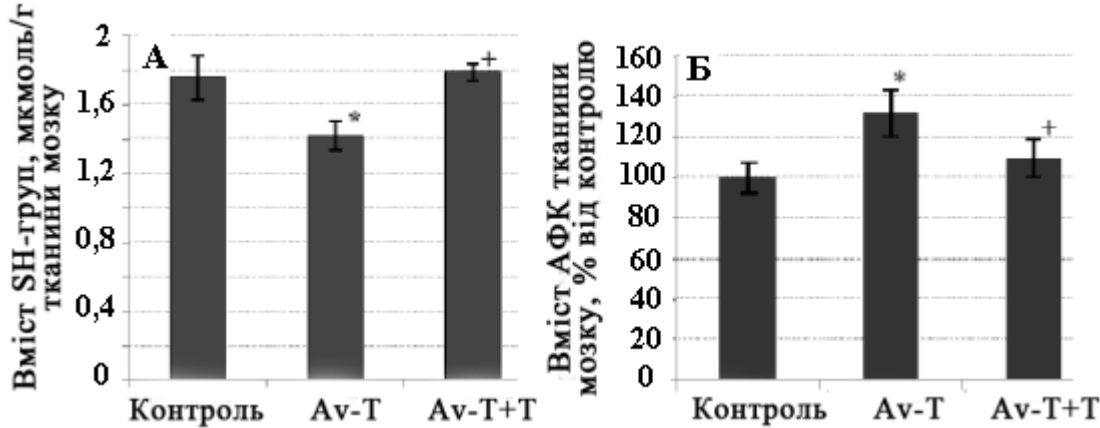
**Загальна характеристика використаних в роботі тваринних моделей ТД.** В умовах аліментарного  $V_1$ -авітамінозу (Av-T) вміст загального тіаміну в печінці суттєво зменшувався, складаючи біля 10% від такого ж показника у контрольній групі (Рис. 1 А). За вказаних умов відбувалось також зниження вмісту ТДФ в тканині мозку майже вдвічі, значення у групі Av-T складало 47,4% від контролю (Рис.1 Б). Одноразове введення щурам тіаміну за добу до кінця досліду не приводило до нормалізації вмісту загального тіаміну в печінці та ТДФ в мозку щурів.



**Рис. 1.** Вміст тіаміну у печінці (А) та ТДФ у мозку (Б) щурів з аліментарним  $V_1$ -авітамінозом (Av-T) та одноразовим введенням 200 мкг тіаміну (Av-T + T) за добу до декапітації. Дані

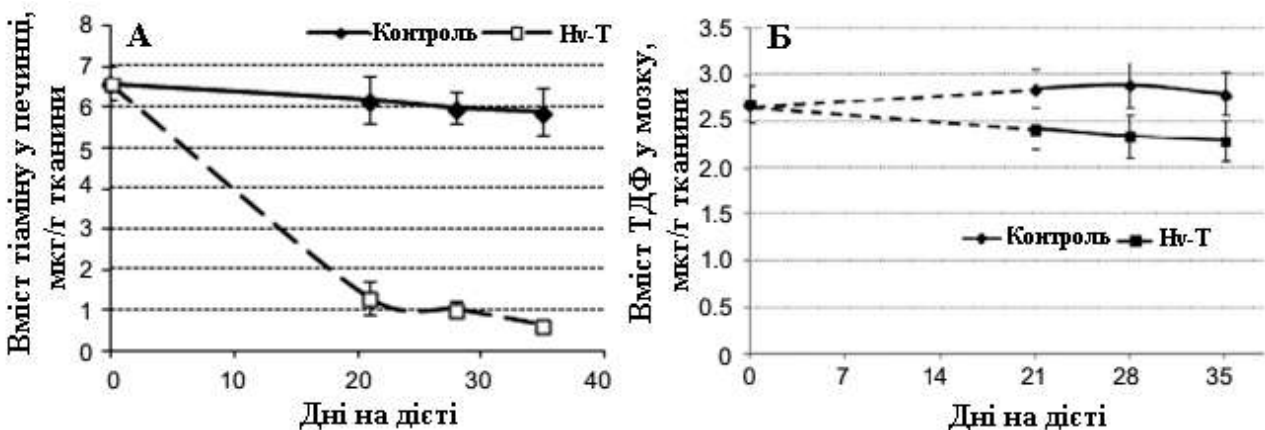
представлено як  $M \pm m$ . ( $n=6-7$ ).  $*P < 0.05$  у порівнянні з контролем,  $+P < 0.05$  у порівнянні з Av-T.

Також за умов аліментарного  $B_1$  авітамінозу спостерігається порушення Red-Ox балансу тканини мозку, що відбивається на підвищенні рівня АФК та зниженні вмісту SH-груп, однак одноразового введення тіаміну вистачає для нормалізації рівня обох показників (Рис. 2).



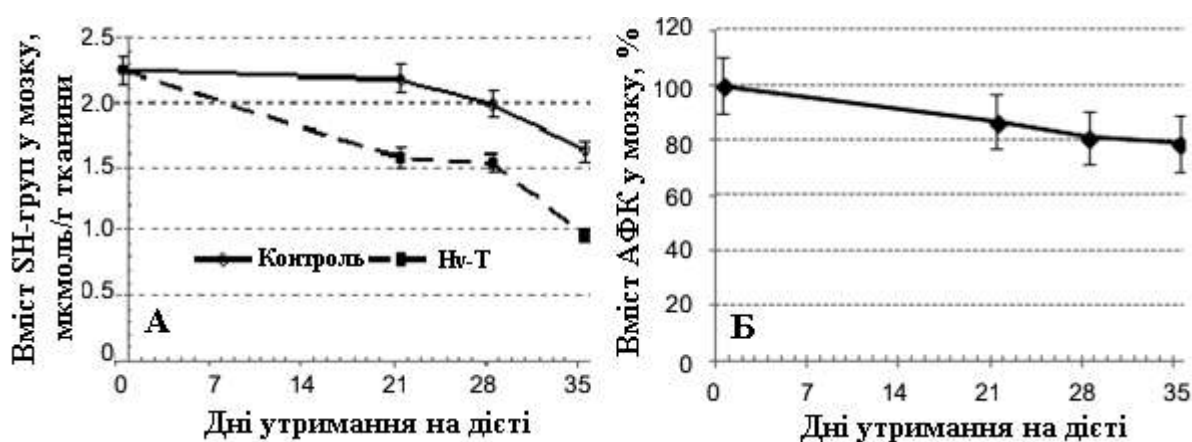
**Рис. 2.** Вміст SH-груп (А) та АФК (Б) в мозку щурів з моделлю аліментарного авітамінозу (Av-T) до та після одноразового введення 200 мкг тіаміну на 1 кг ваги за добу до декапітації. Дані представлено як  $M \pm m$  ( $n=6-7$ ).  $*P < 0.05$  у порівнянні з контролем,  $+P < 0.05$  у порівнянні з Av-T.

В умовах аліментарного  $B_1$ -гіповітамінозу (Hv-T) вже на 21й день розвитку стану спостерігається зниження вмісту тіаміну у печінці (у 4,8 рази у порівнянні з показником контролю) (Рис. 3А), тоді як вміст ТДФ у гомогенаті мозку починає знижуватись лише після четвертого тижня утримання щурів на Hv-T дієті, та до кінця експерименту різниця у показниках між контрольною та Hv-T групою не перевищує 15-20% (Рис. 3Б). Ці дані демонструють, що під час нестачі тіаміну організм намагається підтримати адекватний вміст вітаміну (та, відповідно, його коензимної форми) навіть у випадку (та, можливо, за рахунок) «збіднення» на тіамін решти тканин.



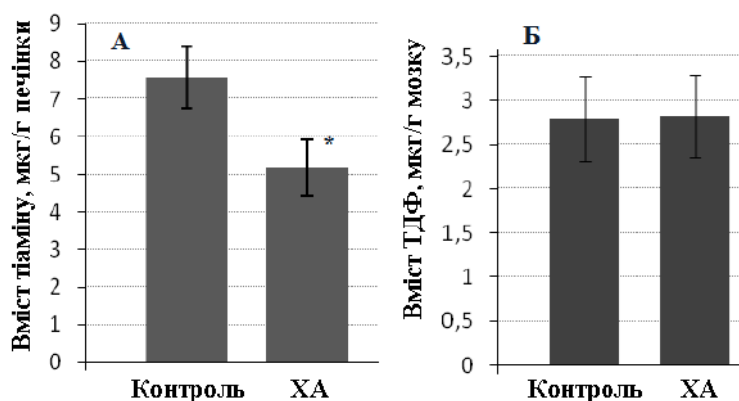
**Рис. 3.** Вміст тіаміну в печінці (А) та ТДФ в мозку (Б) контрольних і дослідних щурів у динаміці розвитку гіповітамінозу. Дані представлено як  $M \pm m$ . ( $n=6-7$ ).

На Рис. 4 представлено дані по динаміці змін показників Red-Ox стану тканини мозку за умов розвитку  $V_1$ -гіповітамінозу. Результати демонструють, що так само, як і за умов Ав-Т, вміст SH-груп в мозку щурів групи Нv-Т є зниженим відповідно контролю протягом всього терміну утримання їх на гіповітамінозній дієті (Рис. 4А). Вміст АФК, на відміну від моделі Ав-Т, знижується в мозку Нv-Т щурів після трьох тижнів дієти і продовжує поступово зменшуватися до кінця експерименту (Рис. 4Б). Зменшення вмісту АФК протягом експерименту у групі Нv-Т можна пояснити уповільненням окиснювально-відновних реакцій у клітинах за цих умов. Можливо також, що кількості тіаміну, яка надходить в мозок за цих умов, достатньо для нейтралізації надлишкового утворення вільних радикалів. Останнє припущення є цілком можливим, оскільки похідні тіаміну здатні взаємодіяти з такими структурами (Parkhomenko, et al., 2012.).



**Рис. 4.** Вміст SH-груп (А) та АФК (Б) в мозку щурів з моделлю аліментарного гіповітамінозу (Нv-Т) у динаміці розвитку патологічного стану. Дані представлено як  $M \pm m$ . ( $n=6-7$ ).

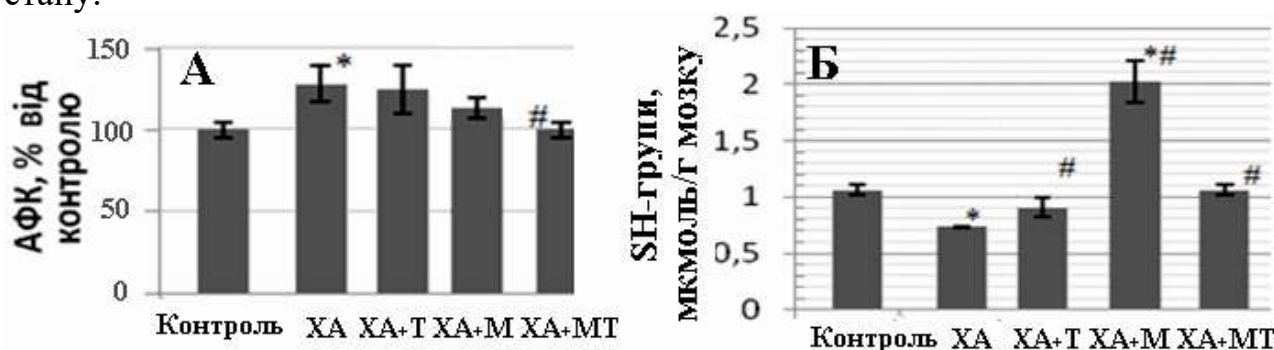
За умов хронічного споживання щурами 15% розчину етанолу вміст тіаміну у печінці знижувався на 35% у порівнянні з контрольною групою (Рис. 5А), тоді як вміст ТДФ у головному мозку залишався на рівні контролю (Рис. 5Б).



**Рис. 5.** Вміст тіаміну в печінці (А) та ТДФ (Б) в мозку щурів з моделлю хронічного алкоголізму (XA). Дані представлено як  $M \pm m$ . ( $n=6-7$ ). \* $P < 0.05$  у порівнянні з контролем

Для оцінки Red-Ox стану головного мозку щурів за умов хронічного споживання етанолу ми також дослідили зміни вмісту АФК (Рис. 6А) та вільних SH-груп (Рис. 6, Б) та перевірили дієвість введення препарату

Метовітан окремо та разом з тіаміном для корекції Red-Ox змін патологічного стану.

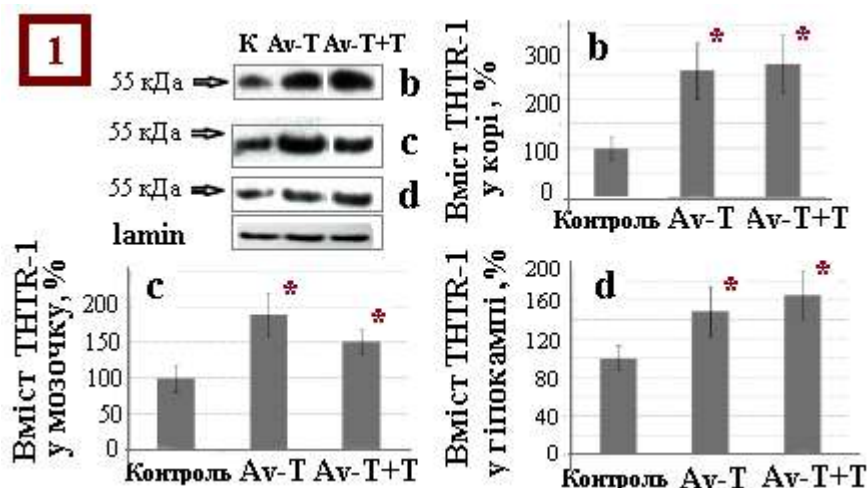


**Рис 6.** Рівень АФК (А) та SH-груп (Б) в мозку щурів за хронічного алкоголізму (ХА) та після одноразового введення тіаміну(ХА+Т), Метовітану (ХА+М) або їх комбінації (ХА+МТ) , Дані представлено як М±m. (n=6-7).\*P < 0.05 у порівнянні з контролем, +P < 0.05 у порівнянні з ХА.

Дані демонструють, що на фоні хронічного алкоголізму підвищується рівень АФК та знижується рівень SH-груп в тканині мозку. Проте введення високої дози тіаміну підвищує лише останній показник, в той час як обидва показники повертаються до норми при введенні разом з тіаміном препарату Метовітан (рис. 6), який ймовірно сприяє корекції Red-Ox стану тканини.

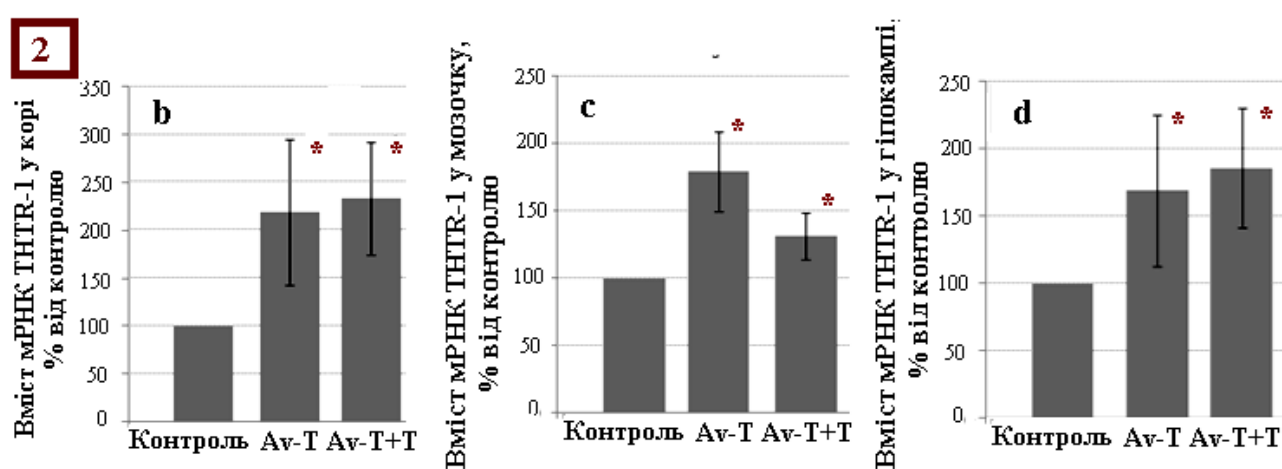
Узагальнюючи дані цього розділу, можна зробити кілька висновків: по-перше, усі досліджувані тіамін-дефіцитні стани характеризуються зниженням вмісту тіаміну у печінці та підтриманням максимально можливого рівня ТДФ у головному мозку, що свідчить про пріоритетність нервової тканини у розподілі тіаміну та важливості нормального стану його метаболізму. По-друге глибокий аліментарний дефіцит тіаміну (авітаміноз) призводить до порушення Red-Ox балансу в клітинах мозку щурів так само, як і у щурів з моделлю хронічного алкоголізму, але не в умовах повільного зниження вмісту тіаміну в тканинах за умов гіповітамінозу. Одноразове введення високої дози тіаміну щурам з аліментарним авітамінозом призводило до нормалізації показників Red-Ox балансу в мозку, тоді як у випадку хронічного споживання алкоголю нормалізація показників виявилася можливою тільки за сумісного введення тіаміну з препаратом Метовітан - потужним антиоксидантом.

**Вміст THTR-1 та експресія гену *slc19a2* у головному мозку щурів за умов різної забезпеченості організму тіаміном.** За умов глибокого Ав-Т відбувається зростання вмісту THTR-1 у всіх досліджених відділах (Рис. 7), найбільш виразно у корі великих півкуль (Рис. 7b) – у 2,5 рази у порівнянні з показником контрольної групи. Одноразове введення вітаміну за добу до декапітації не вплинуло на вміст протеїну THTR-1 у жодному з відділів. Дані ПЛР (Рис. 7.2) продемонстрували, що Ав-Т активує біосинтез THTR-1 на рівні експресії у всіх відділах, найбільш виразно у корі великих півкуль (у 2,2 рази у порівнянні з контролем) (Рис 7. 2 b). При введенні тіаміну цей показник був на рівні Ав-Т групи.



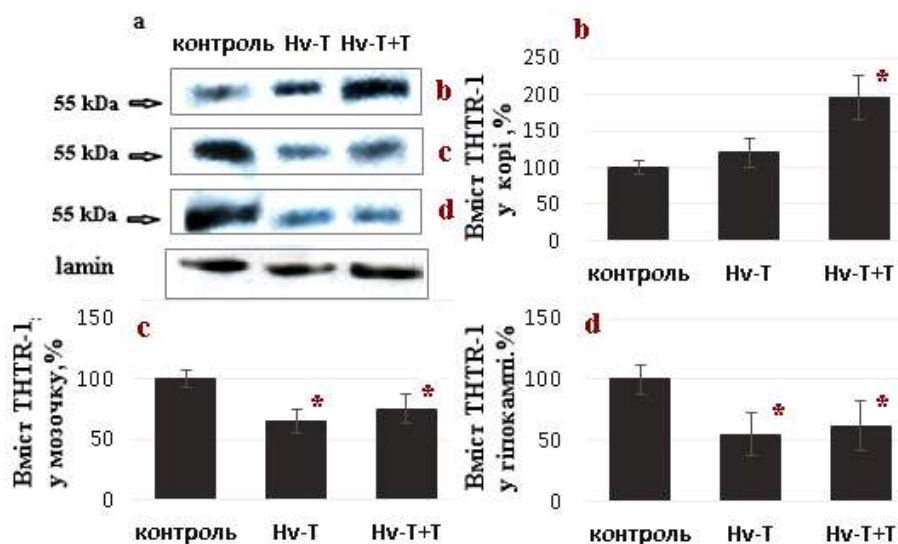
**Р и с. 7.** Відносний вміст (1) та рівень експресії м-РНК THTR-1 (2) у корі великих півкуль (b), мозочку (c) та гіпокампі (d). тварин контролю, з авітамінозом (Av-T) та групи з введенням 200 мкг тіаміну за добу до декапітації (Av-T+T).

Дані представлено як  $M \pm m$ . ( $n=7$ ) \* $P < 0.05$  у порівнянні з контролем.



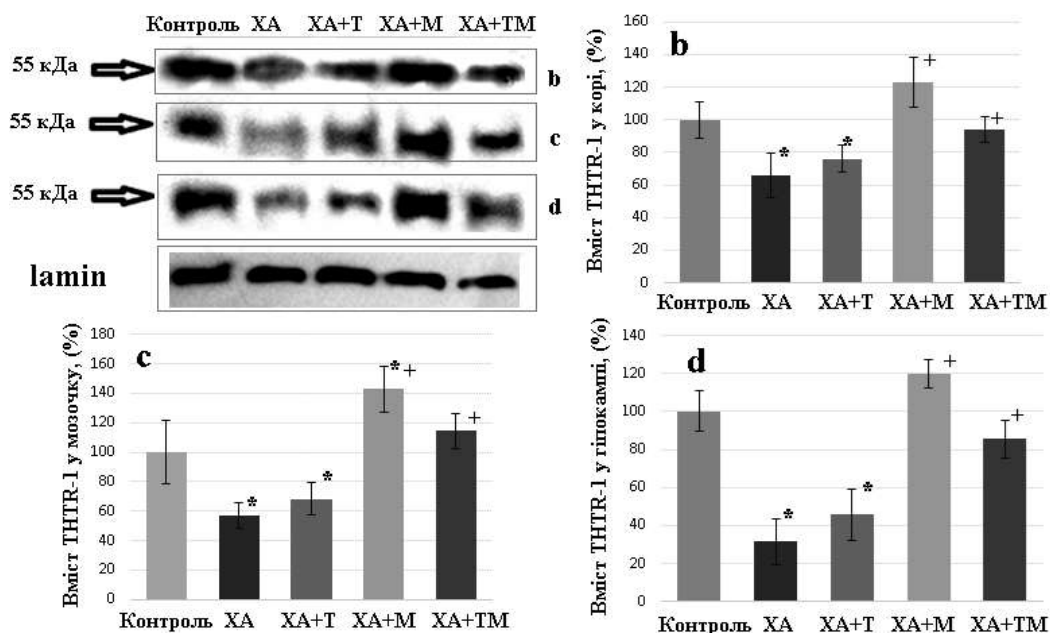
Таким чином, результати демонструють що  $B_1$ -авітаміноз приводить до підвищення експресії гену *slc19a2*, що відповідає за синтез THTR-1, у всіх відділах, і одноразове введення щурам з Av-T тіаміну не сприяє поверненню показника до норми. Якщо ми повернемося до даних щодо вмісту ТДФ в мозку в групі Av-T + T (Рис. 1Б), то цей показник, як і вміст протеїну THTR-1, не повертається до рівня контролю за умов одноразового введення тіаміну. На нашу думку, отримані у цій серії експериментів результати дають підстави припустити, що саме вміст ТДФ в клітинах може бути фактором, що регулює біосинтез транспортера THTR-1.

Щодо інших досліджених ТД станів, то вміст транспортера тіаміну в відділах мозку за умов Hv-T змінювався неоднаково (Рис. 8): знижувався в мозочку і гіпокампі (в 1,5 і 2 рази відповідно) (Рис. 8 с, d.), тоді як в корі великих півкуль вміст THTR-1 залишився на рівні контролю. При введенні тіаміну в корі спостерігалось різке збільшення імунореактивності THTR-1 майже в 2 рази відносно контрольної групи, тоді як у мозочку і гіпокампі показник у групі Hv-T+T не відрізнявся від групи з гіповітамінозом.



**Рис. 8.** Відносний вміст THTR-1 у відділах головного мозку тварин: контролю, з гіповітамінозом (Hv-T) та групи з введенням 200 мкг тіаміну за добу до декапітації (Hv-T+T). Блотограма відділів (а), вміст THTR-1 у корі великих півкуль (б), мозочку (с) та гіпокампі (д). Дані представлено як  $M \pm m$ . ( $n=6-7$ ) \* $P < 0.05$  у порівнянні з контролем

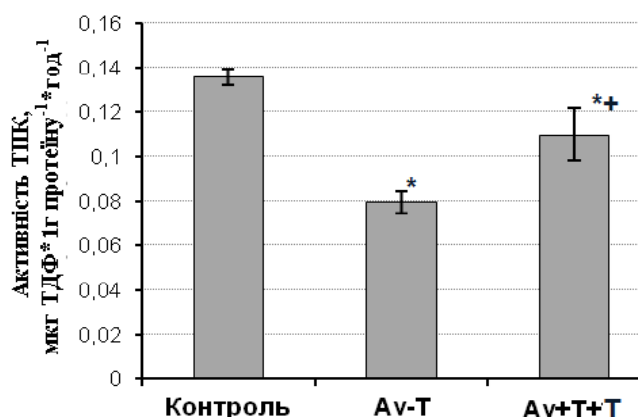
Хронічне споживання алкоголю знижує вміст THTR-1 у всіх відділах, що досліджувались, у півтора - два рази по відношенню до показника контролю (Рис.9). Введення високої дози тіаміну жодним чином не вплинуло на вміст THTR-1, тоді як введення «Метовітану» привело до різкого зростання показника у корі, мозочку та гіпокампі у 2,3, 3,3 та 3,6 разів відповідно. Сумісне введення нормалізувало вміст THTR-1 у відділах. Отже, тіамін може використовуватись для корекції пошкоджень нервової тканини, спричинених вживанням алкоголю тільки за умов відновлювання Red-Ox балансу нервової тканини введенням препарату з вираженою антиоксидантною дією.



**Рис.9.** Відносний вміст THTR-1 у відділах головного мозку тварин: контролю, з алкогольною залежністю (ХА), з одноразовим введенням 200 мкг тіаміну (ХА+Т), «Метовітану» (ХА+М) та з комбінованим введенням (ХА+ТМ). Блотограма усіх відділів (а), вміст THTR-1 у корі (б), мозочку (с) та гіпокампі (д). Дані представлено як  $M \pm m$ . ( $n=6-7$ ). \* $P < 0.05$  у порівнянні з контролем, + $P < 0.05$  у порівнянні з ХА.

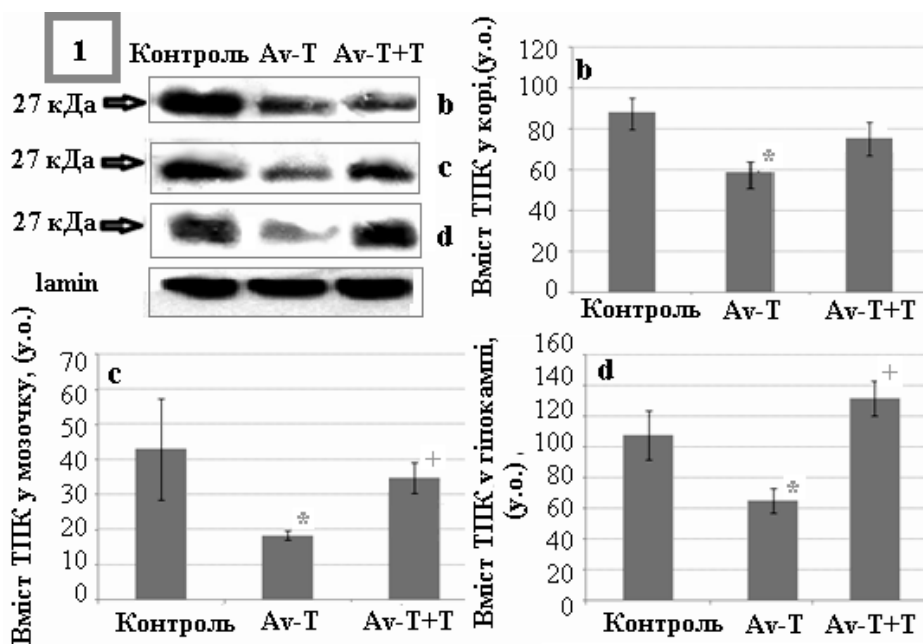
Таким чином, продемонстровано порушення транспорту тіаміну (за вмістом THTR-1) за умов дефіцитних станів різного ступеня важкості та різної етіології. За умов аліментарного ТД можна бачити дію компенсаторного механізму, що виражається у посиленні синтезу транспортеру. Найбільш чутливою ділянкою мозку за вмістом THTR-1 виявилася кора великих півкуль, адже вона першою демонструвала виразну компенсаторну відповідь на нестачу тіаміну – вже за умов гіповітамінозу вміст THTR-1 суттєво підвищувався, тоді як у мозочку та гіпокампі ще спостерігалась тенденція до зниження вмісту протеїну. За умов тривалої дії алкоголю (дев'ять місяців вживання 15% розчину етанолу) вміст THTR-1 у відділах мозку знижується у порівнянні з відповідним показником контрольної групи. Введення одного лише тіаміну не приводить до нормалізації вмісту THTR-1 за вказаних умов. Однак у випадку сумісного введення тіаміну з препаратом «Метовітан», що має виразну антиоксидантну дію, показник нормалізується до рівня контролю, також як і вміст АФК в мозку за цих же умов (Рис. 6, А). Тобто, порушення Red-Ox балансу може блокувати нормалізацію рівня THTR-1 при введенні тіаміну.

**Активність, вміст ТПК та експресія *tpk-1* в мозку щурів за умов різної забезпеченості організму тіаміном.** Аналіз активності ТПК в тканині мозку щурів в групі Ав-Т (рис. 10) показав різке зниження цього показника (у 1,7 разів у порівнянні з контролем) і наближенні його до контрольного значення після введення тваринам з Ав-Т тіаміну за добу до декапітації.



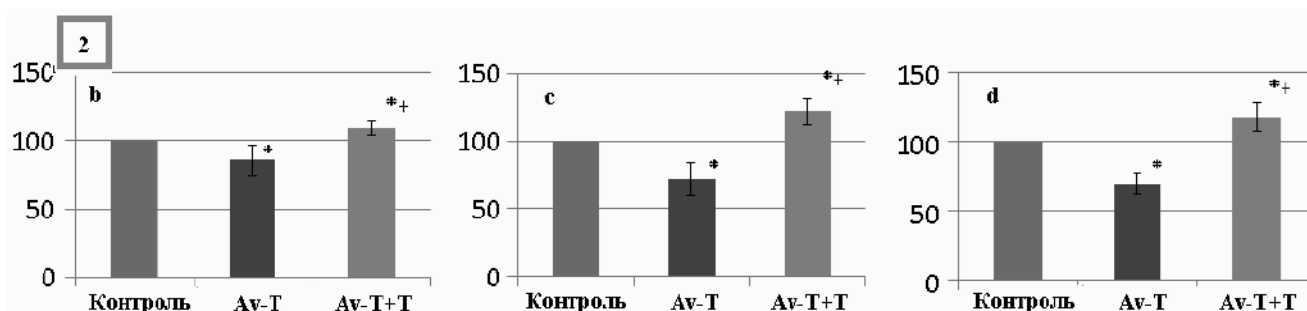
**Рис. 10** Середні значення активності тіамініпрофосфокінази (мкг ТДФ /г протеїну · год) у тканині мозку тварин контролю, з авітамінозом (Ав-Т), та з введенням тіаміну (Ав+Т). Дані представлено як  $M \pm m$ . ( $n=6-7$ ) \* $P < 0.05$  у порівнянні з контролем, + $P < 0.05$  у порівнянні з Ав-Т.

Отримані нами дані (Рис. 11) показали, що в умовах глибокого аліментарного ТД відносний вміст ТПК достовірно знижувався у всіх відділах: в корі приблизно на 35%, в мозочку – більш, ніж вдвічі, а в гіпокампі - на 40% відносно контролю ( $P < 0.05$ ). Одноразове введення тіаміну у кількості 200 мкг/100 г ваги призводило до суттєвого зростання рівня цього показника відносно групи Ав-Т в мозочку і гіпокампі (на 170 і 200% відповідно). Але в корі великих півкуль (Рис. 11, 1 b) відновлення вмісту протеїну ТПК за вказаних умов не відбулося, спостерігається лише тенденція до підвищення, що, можливо, є наслідком повільнішого обміну тіаміну в цій структурі, ніж в мозочку і гіпокампі.



**Рис. 11.** Відносний вміст (1) та рівень експресії м-РНК ТПК з референсним геном HPRT (2) у корі великих півкуль (b), мозочку (c) та гіпокампі (d) тварин контролю, з авітамінозом (Av-T) та групи з введенням тіаміну (Av-T +T).

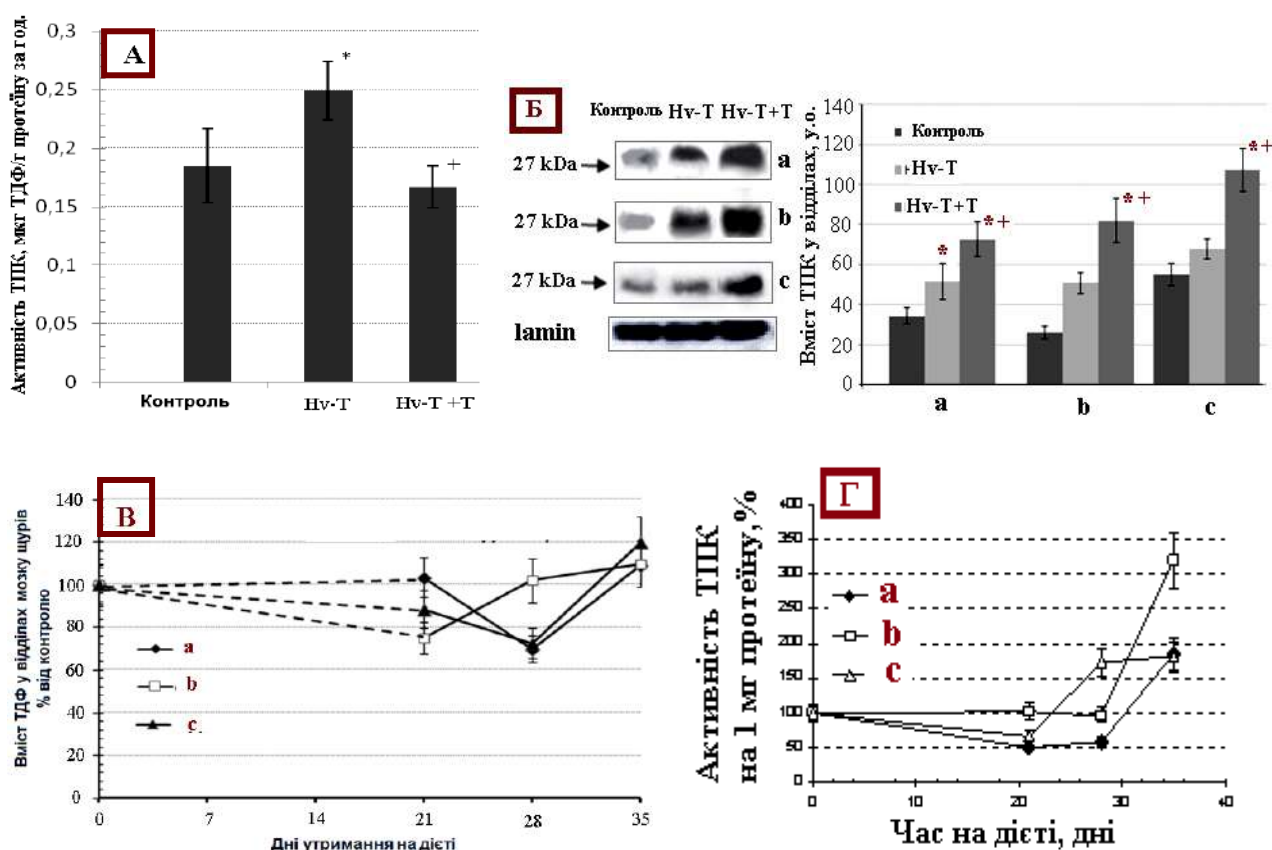
Дані представлено як  $M \pm m$ . ( $n=6-7$ ) \* $P < 0.05$  у порівнянні з контролем, + $P < 0.05$  у порівнянні з Av-T.



Для того, щоб визначити, чи означені зміни у вмісті ТПК відбуваються на рівні експресії, було проведено ПЛР у реальному часі з визначенням кількості мРНК ТПК. Було виявлено зниження експресії гену ТПК в групі Av-T у всіх відділах, що досліджувались (рис. 11,2), однак у гіпокампі і мозочку зниження було більш суттєве (на 40 і 35% відповідно), тоді як кора виявилась більш стійкою – показник у групі Av-T знижувався лише на 15% у порівнянні з контрольним (Рис. 11, 2А). Одноразове введення тіаміну привело до зростання показника в усіх трьох відділах, найбільш суттєво – у мозочку.

Дослідження активності ТПК у мозку щурів з гіповітамінозом показало, що за цих умов активність ензиму зростає у 1,7 разів відносно контрольної групи, що може пояснюватись компенсаторною реакцією організму на нестачу тіаміну, тоді як введення тіаміну нормалізує цей показник до контрольних значень (рис. 12, А). Також ми дослідили зміни активності ензиму і вміст ТДФ у різних відділах головного мозку в процесі розвитку гіповітамінозу на 21й, 28й та 35й день. Результати наведено на Рис 12 Б та В.



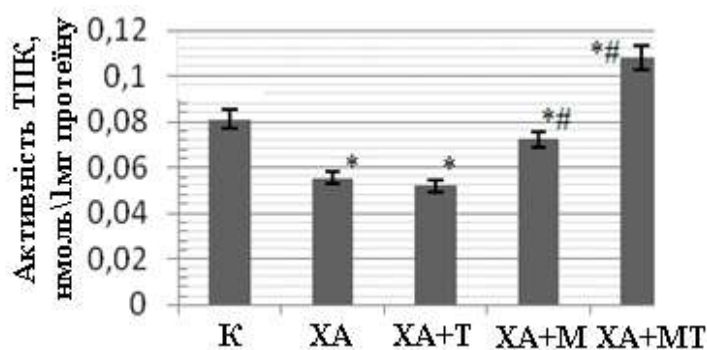


**Рис. 12.** А - середні значення активності тіамінопірофосфокінази (мкг ТДФ/г протеїну · год) у тканині мозку тварин контролю, з гіповітамінозом (Hv-T) та групи з введенням тіаміну (Hv-T + T). Б - відносний вміст ТПК тварин контролю, з гіповітамінозом (Hv-T) та з введенням тіаміну (Hv-T+T) наприкінці експерименту: блотограма та вміст ТПК у корі великих півкуль(a), мозочку (b) та гіпокампі (c); В - вміст ТДФ у % від того ж показника для контролю; Г- активність ТПК в розрахунку на 1 мг протеїну у % від значення показника для парного контролю. Дані представлено як  $M \pm m$ . ( $n=6-7$ ) \* $P < 0.05$  у порівнянні з контролем, + $P < 0.05$  у порівнянні з Hv-T.

Дані, наведені на рисунках 12 В та Г показують, що існує зворотна кореляція між активністю ТПК та вмістом ТДФ у відділах головного мозку (з деяким відставанням у активності ТПК). Тобто, збільшення активності ТПК у відділах головного мозку спостерігалось лише після попереднього зменшення концентрації ТДФ до певного рівня, і цей процес ймовірно, супроводжувався збільшенням продукції ТДФ. Дані, показані на Рис. 12 Б, демонструють підвищення рівня імунореактивності ТПК у всіх ділянках мозку на пізніх стадіях Hv-T. А одноразове введення тіаміну стимулює зростання показника ще більше. Вочевидь ТДФ, як продукт реакції, може брати участь у регуляції експресії ТПК в нервових клітинах.

У шурів, що вживали алкоголь, спостерігалось зниження активності ТПК у 1,6 разів відносно контрольної групи (Рис. 13). За введення тіаміну не відбулося зміни показника, однак в групі з введенням Метовітану активність ТПК майже досягала рівню контролю. Сумісне введення препаратів призвело до підвищення його вмісту більш ніж на третину відповідно значення у контролі (рис. 13). Це свідчить про те, що порушення Red-Ox балансу може якимось чином впливати на статус ТПК у клітинах. Висновок підтверджується тим

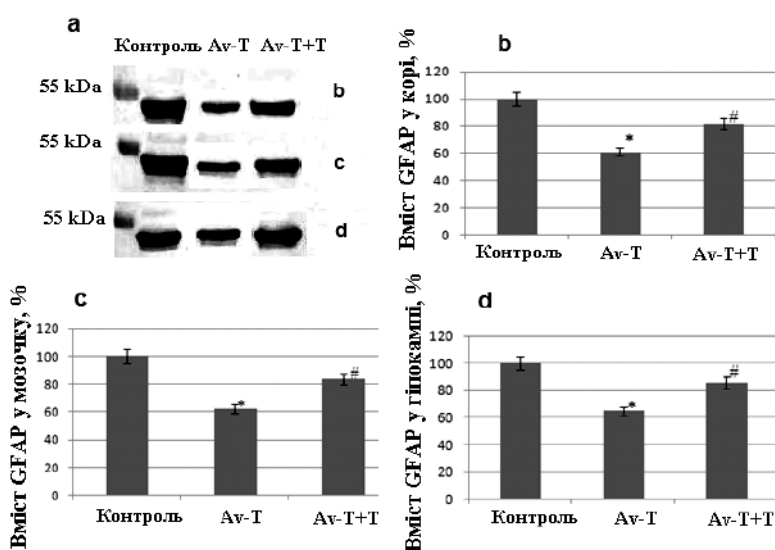
фактом, що нормалізація окисно-відновного стану у клітинах введенням препарату «Метовітан» приводить до нормалізації і параметрів стану ТПК.



**Рис. 13.** Середня активність ТПК (нмоль ТДФ/мг протеїну · год) у тканині мозку тварин: контролю (К), з хронічним алкоголізмом (ХА), введенням тіаміну (ХА + Т), Метовітану (ХА+М), та сумісним введенням (ХА+ МТ) . Дані представлено як  $M \pm m$ . ( $n=6-7$ ) \* $P < 0.05$  у порівнянні з контролем, # $P < 0.05$  у порівнянні з ХА.

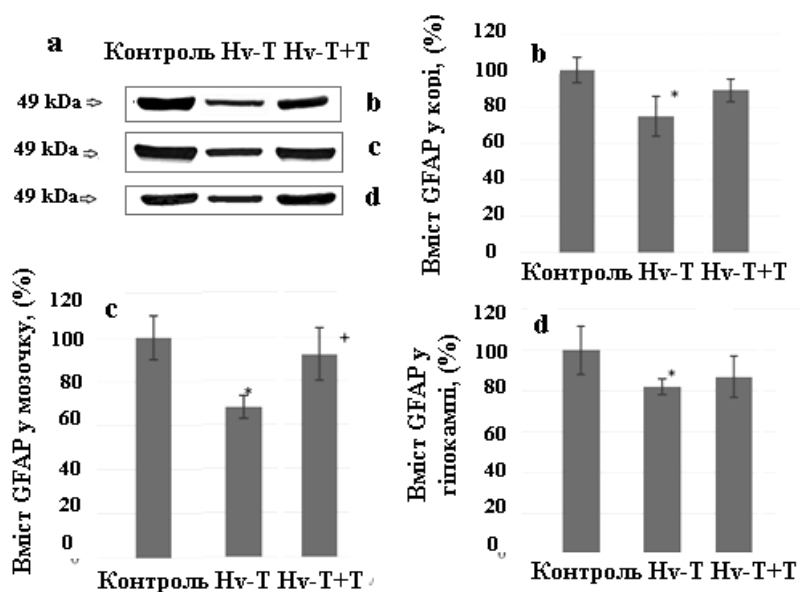
Отже, продемонстровано тіамін-залежну регуляцію біосинтезу ТПК у нервовій тканині, а також наявність зворотної залежності між активністю ензиму та рівнем ТДФ. Виявлено негативний вплив порушення Red-Ox балансу на вміст та активність ензиму за умов хронічного споживання алкоголю, що підтверджується тим фактом, що відновлення обох показників можливо тільки за сумісного введення тіаміну з препаратом Метовітан (і ця комбінація також нормалізує Red-Ox баланс тканини).

**Вміст нейроспецифічних протеїнів цитоскелету за умов різної забезпеченості організму тіаміном.** Дані імуноблотингу демонструють, що розвиток Ав-Т знижує вміст GFAP у всіх відділах мозку, в середньому, до 60% від контрольного значення (Рис. 14). При одноразовому введенні тіаміну спостерігається часткове відновлення вмісту астроцитарного маркера, який у різних відділах мозку збільшується до 80% від контрольного значення.



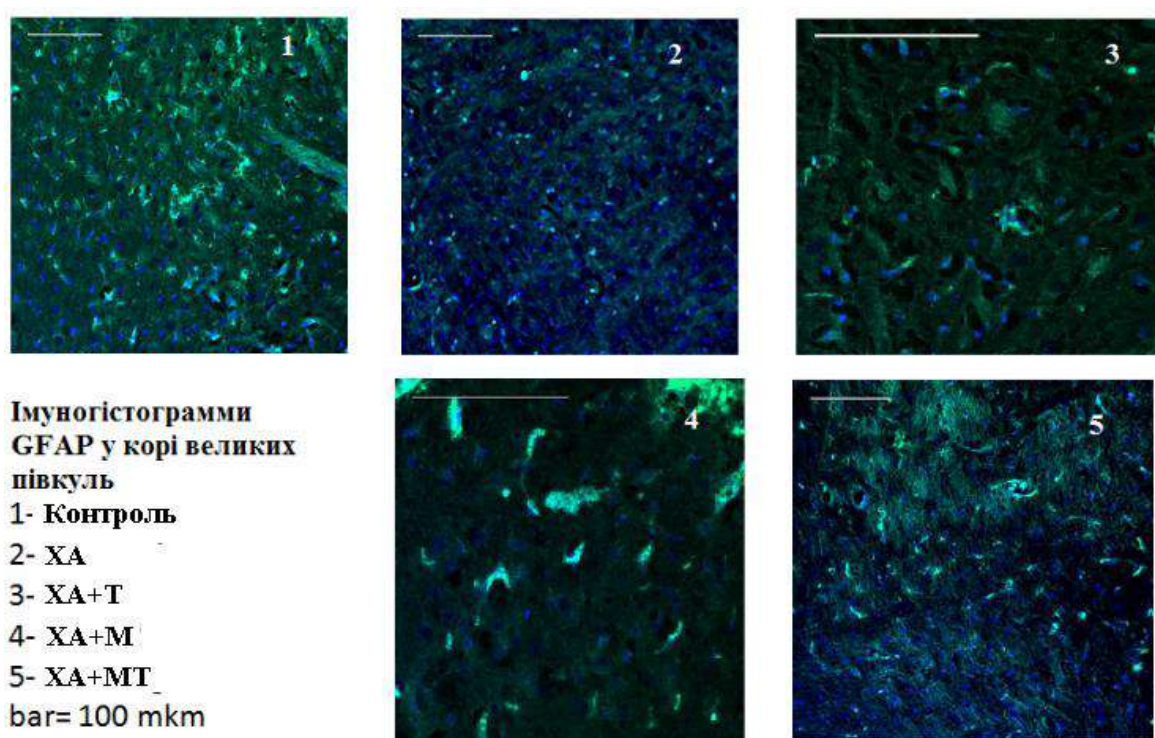
**Рис. 14** Відносний вміст гліального фібрилярного кислого протеїну тварин контролю, з аліментарним авітамінозом (Ав-Т), та з введенням тіаміну (Ав-Т+Т). Блотограма усіх відділів (а), вміст GFAP у корі великих півкуль (b), мозочку (c) та гіпокампі (d). Дані наведено у відсотках від контролю. Дані представлено як  $M \pm m$ . ( $n=6-7$ ) \*-  $P < 0,05$  по відношенню до контрольного значення, #-  $P < 0,05$  по відношенню до групи Ав-Т.

У випадку Нв-Т відбувалося менш значне зменшення вмісту GFAP. Однак в цих умовах також спостерігався розвиток астрогліальної дисфункції. Найбільш чутливою структурою до Нв-Т виявився мозочок (рис. 15 с), однак саме в ньому введення тіаміну мало найбільший ефект – рівень GFAP нормалізувався до контрольного значення.

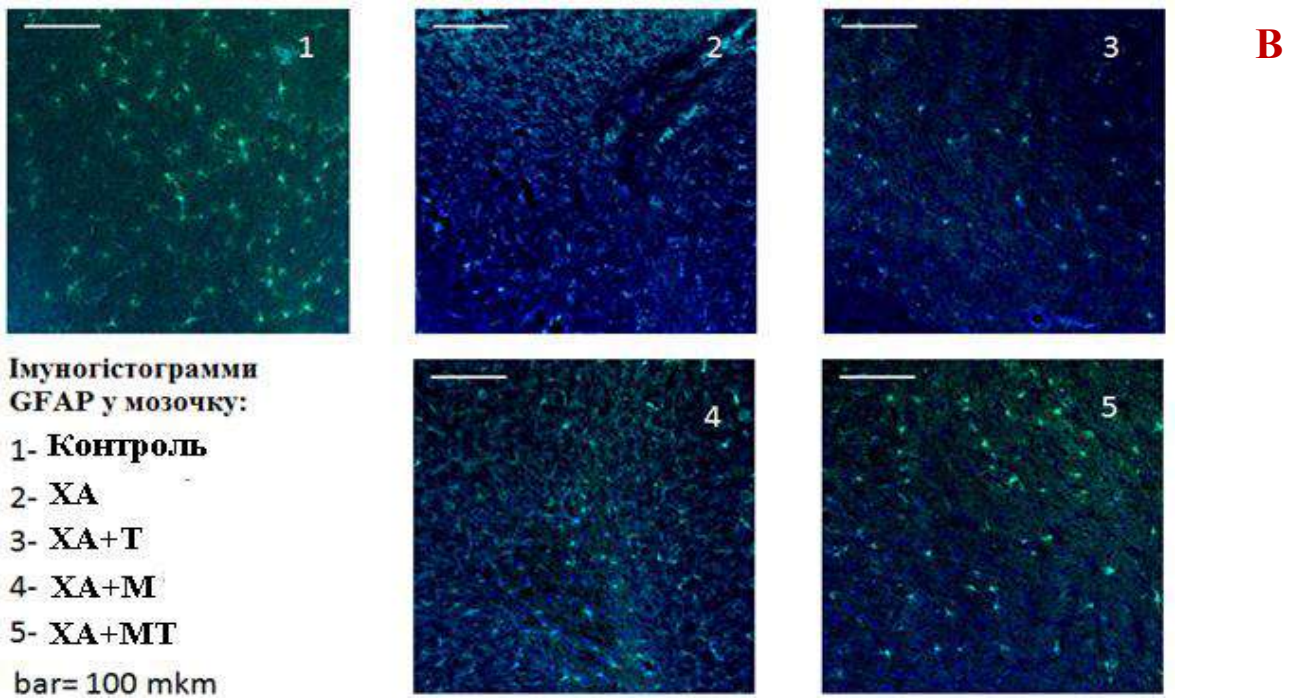


**Рис. 15** Відносний вміст гліального фібрилярного кислого протеїну. Блотограма (a) та вміст GFAP у корі великих півкуль (b), мозочку (c) та гіпокампі (d) тварин контролю, з гіповітамінозом (Hv-T), та з введенням тіаміну (Hv-T+T). Дані наведено у відсотках від контролю. Дані представлено як  $M \pm m$ . (n=5-6) \*-  $P < 0,05$  по відношенню до контрольного значення, +-  $P < 0,05$  по відношенню до групи Hv-T.

За умов хронічного алкоголізму зміни вмісту GFAP були глибокими: на імуногістограмі тканин мозочку та кори (рис. 16 (A2) та (B2)) тварин з алкогольної групи сигнал GFAP+ клітин був майже відсутній, та введення самого лише тіаміну не призводило до суттєвого покращення, особливо у мозочку (рис 16(A3) та (B3)). Однак комбінація тіаміну з Метовітаном мала виразну нормалізуючу дію як у мозочку, так и у корі великих півкуль (рис. 16 (A5) та (B5)), що може пояснюватись потужною антиоксидантною дією препарату.



**A**



**Рис. 16.** Імуногістограми кори великих півкуль (А) та мозочку (В) контрольних тварин (1), тварин що хронічно споживали розчин етанолу (2) та після цього отримали одноразово за добу до декапітації 200 мкг/кг тіаміну (3), 200 мкг/кг Метовітану (4) або комбінацію препаратів (5). Зелене забарвлення – GFAP. Var= 100 мкм.

Ми дослідили зміни вмісту триплету нейрофіламентів (NF). Це є компонент проміжних філаментів нейронів, маркер функціонального стану нейронів. За умов Нv-Т жодних змін у вмісті NF не відбувалося (дані не показано), хоча клітини глії вже зазнавали негативних змін (рис. 15). Це свідчить про те, що навіть за умов часткового пригнічення астроцити здатні виконувати нейропротекторну функцію.



**Рис. 17.** Блотограма триплету нейрофіламентів у корі великих півкуль, мозочку та гіпокампі тварин контролю, з авітамінозом (Av-T) та групи з введенням тіаміну (Av-T+T).(n=6-7)

Зміни в рівні NF спостерігаються тільки за умов глибокого дефіциту тіаміну (рис. 17) – аліментарного авітамінозу, причому зниження вмісту протеїнів відбувається тільки в одному з трьох досліджених відділів - у мозочку, що підтверджує повідомлення інших авторів (Patrick J Mulholland, 2006; Nauti et al., 1997) про підвищену чутливість цієї структури до ТД. Показник у групі Av-T знижується до 65% відносно контрольного значення, однак введення тіаміну нівелює ці зміни та навіть стимулює підвищення вмісту NF – значення у групі Av-T+T на 20% перевищує рівень контролю. В корі великих півкуль та гіпокампі змін ані за умов патологічного стану, ані за корекції не спостерігається. Результати, наведені у цьому розділі демонструють, що серед клітин нервової тканини найбільшу чутливість до ТД проявляють астроцити, що цілком узгоджується з попередніми повідомленнями (Afadlal et al., 2014; Alan S Hazell, n.d.). Навіть у випадку Hv-T глія демонструє часткове пригнічення, тоді як рівень NF залишається без змін. За умов Av-T при введенні тіаміну у першу чергу відновлюється вміст триплету, тоді як вміст астроцитарного маркера підвищується лише частково, що свідчить про пріоритетність нейронів при розподілі тіаміну у головному мозку. Хронічне споживання алкоголю призводить до суттєвого зниження GFAP і відновити його вміст введенням високої дози тіаміну неможливо, однак сумісне введення тіаміну з препаратом Метовітан підвищує вміст GFAP<sup>+</sup> клітин до контрольного рівня.

## ВИСНОВКИ

Вперше проведено комплексне дослідження стану протеїнів, від яких залежить швидкість синтезу ТДФ у нервових клітинах, а саме, транспортера тіаміну (THTR-1) і тіамініпрофосфокінази (ТПК) та маркерних протеїнів цитоскелету нервових клітин, за умов дефіциту тіаміну (ТД) різної етіології. Отримані результати дозволяють зробити наступні висновки.

1. Усі досліджені ТД стани (авітаміноз, гіповітаміноз та хронічний алкоголізм) характеризуються зниженням вмісту тіаміну в печінці та підтриманням максимально можливого рівню ТДФ у головному мозку, що свідчить про пріоритетність нервової тканини у розподілі тіаміну в організмі.
2. Порівняльне дослідження Red-Ox балансу в тканині мозку при В<sub>1</sub>-авітамінозі і В<sub>1</sub>-гіповітамінозі свідчить, що обмежене, але постійне надходження тіаміну попереджає розвиток ознак оксидативного стресу, що підтверджує можливість прямої або опосередкованої взаємодії молекули тіаміну із вільними радикалами за фізіологічних умов. Одноразове введення високої дози тіаміну щурам з аліментарним авітамінозом приводить до нормалізації загальних показників Red-Ox балансу в мозку
3. Підвищення вмісту THTR-1, яке відбувається на рівні експресії гену *slc19A2* у всіх відділах мозку, що досліджувались, за умов аліментарного авітамінозу, неможливо нівелювати введенням високої дози тіаміну
4. Порушення Red-Ox балансу у бік розвитку окиснювального стресу за авітамінозу може спричиняти гальмування біосинтезу ТПК на етапі трансляції

цього протеїну. Вміст та активність ТПК частково відновлюється одноразовим введенням високої дози тіаміну.

5. Хронічне споживання алкоголю приводить до зниження активності і вмісту як THTR-1, так і ТПК у корі великих півкуль, мозочку та гіпокампі щурів, що свідчить про відмінність цієї моделі ТД від моделей аліментарного походження за етіологією.
6. Зміни в стані транспортера тіаміну і тіамініпрофосфокінази за умов В<sub>1</sub> гіпо- та авітамінозу протилежно спрямовані, що свідчить про спряженість їх функціонування у клітинах.
7. Продемонстровано підвищену чутливість астроцитів до ТД різного ступеня – навіть за умов обмеженого надходження тіаміну спостерігається зниження вмісту GFAP. Ці зміни зворотні, про що свідчить підвищення вмісту протеїну при одноразовому введенні вітаміну. При хронічному алкоголізмі коригуюча дія вітаміну можлива лише за умов сумісного введення з антиоксидантним препаратом.
8. Зниження вмісту триплету нейрофіламентів спостерігаються тільки за умов глибокого аліментарного авітамінозу, і тільки у мозочку, що вказує на підвищену чутливість цієї структури до ТД. При одноразовому введенні тіаміну у першу чергу відновлюється рівень триплету, тоді як вміст астроцитарного маркера GFAP підвищується лише частково, не досягаючи рівня контролю, що свідчить про пріоритетність нейронів при розподілі тіаміну у головному мозку.

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. **Pavlova O.S.**, Tykhomyrov A.A., Mejenskaya O.A., Stepanenko S.P., Chehivska L.I., Parkhomenko Yu.M. High thiamine dose restores levels of specific astroglial proteins in rat brain astrocytes affected by chronic ethanol consumption / Ukrainian Biochemical Journal , 2019, 91 (4). – 41-49. *(Особистий внесок здобувача – відтворення моделі, вимірювання рівня загального протеїну та тіаміну, статистична обробка результатів, підготовка матеріалів до друку).*

2. Parkhomenko, Y.M., **Pavlova, A.S.** , Mejenskaya, O.A. , Stepanenko, S.P. , Chekhivska, L.I. Thiamine diphosphate synthesis and redox state indicator in the rat brain during B<sub>1</sub> hypovitaminosis/ Ukrainian Biochemical Journal. – 2017, 89 (5). – 84-95; *(Особистий внесок здобувача – відтворення моделей, вимірювання загального протеїну та рівня тіаміну, проведення імуноблотингу для тіамініпрофосфокінази, статистична обробка результатів, підготовка матеріалів до друку).*

3. **Pavlova, A.S.** , Stepanenko, S.P. , Chekhovskaya, L.I. , Tikhomirov, A.A. , Parkhomenko, Y.M. Dependence of Vitamin B 1 Metabolism and the State of Astroglia in the Rat Brain on the Supply with this Vitamin / Neurophysiology, 2016, 48 (5). – 336-345. *(Особистий внесок здобувача – відтворення моделей, вимірювання загального протеїну та рівня тіаміну, проведення імуноблотингу для тіамініпрофосфокінази та транспортеру тіаміну, статистична обробка результатів, підготовка матеріалів до друку).*

4. Parkhomenko, Y.M. , **Pavlova, A.S.** , Mezhenkaya, O.A. Mechanisms Responsible for the High Sensitivity of Neural Cells to Vitamin B<sub>1</sub> Deficiency // *Neurophysiology.* / 2016 48 (6).- С. 429-448. *(Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних з питання, підготовка матеріалів до друку)*

5. Tykhomyrov A.A., **Pavlova A.S.**, Nedzvetsky V.S. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP): on the 45th Anniversary of Its Discovery// *Neurophysiology* – 2016 – 48, №1. – С. 54-71. *(Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних з питання, підготовка матеріалів до друку)*

6. **Павлова О.С.**, Степаненко С. П., Чехівська Л. І., Пархоменко Ю. М. Обмін тіаміну за умов хронічного алкоголізму та його корекції // *Вісник Львівського університету. Серія біологічна.* - 2016.- 74 (спец). – С. 75-81. *(Особистий внесок здобувача – відтворення моделей, вимірювання загального протеїну та рівня тіаміну, проведення імуноблотингу для тіамініпрофосфокінази та транспортеру тіаміну, статистична обробка результатів, підготовка матеріалів до друку).*

7. Меженская О.А., **Павлова А.С.**, Степаненко С.П., Чеховская Л.И., Пархоменко Ю.М. Активности малат- и глутаматдегидрогеназы в тканях зависят от обеспеченности организма витамином В1 ? / *Матер. Межд. Симп. «Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии».* г. Гродно, Беларусь, 2018. .С.369-376. *(Особистий внесок здобувача – відтворення моделей, вимірювання загального протеїну та рівня тіаміну, проведення імуноблотингу для тіамініпрофосфокінази, статистична обробка результатів, підготовка матеріалів до друку).*

8. **О. Pavlova**, Yu. Parkhomenko. THIAMINE TRANSPORTER THTR-1 EXPRESSION INCREASES UNDER NUTRITIONAL THIAMINE DEFICIENCY CONDITIONS AND DOES NOT DEPEND DIRECTLY FROM THIAMINE INPUT INTO THE ORGANISM//*Матеріали конференції – конкурсу молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2015»*, 21-22 березня 2019 року, Укр. біохім. Журн.- 2019

9. Parkhomenko Yu., Protasova Z., **Pavlova A.**, Yanchiy O. Thiamine derivatives use to investigate the modulator role of thiamine in the biosynthesis of acetylcholine from pyruvate// *The 8th International Conference on thiamine: From catalise to patology, 2014.-* Liege, Belgium.- P.30.

10. **О.С. Павлова**, А.О. Тихомиров. Зміни рівня тіамініпрофосфокінази та стан астроглії у головному мозку щурів за умов аліментарного В 1 дефіциту та його корекції // *Матеріали конференції – конкурсу молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2015»*, 23-24 квітня 2015 року, Укр. біохім. Журн.- 2015- С.49.

11. **Павлова А. С.**, Тихомиров А. А., Пархоменко Ю.М. Ключевые протеины обмела тиамина и состояние астроглии головного мозга крыс при алиментарном В 1 -дефиците и его коррекции // *Материалы третьей международной конференции «Актуальные проблемы современной биохимии и клеточной биологии»*, 24-25 сентября 2015 г., Днепропетровск, - С. 79.

12. **О. Pavlova**, А. Tykhomyrov, Yu. Parkhomenko. The thiamine metabolism proteins and rat brain astroglial state at alimentary В 1 deficit and its correction// *Abstracts of X parnas conference young scientist forum “Molecules in*

*the living cell and innovative medicine*”, 10 th -12 th July 2016, Acta Biochimica Polonica. - 2016.- 63 suppl.1 – P.30

13. Parkhomenko Yu.M., Pavlova O.S., Mezhenka O.O., Stepanenko S.P., Chehivska L.I. Do oxidized derivatives of thiamine participate in regulation of its metabolism?// *Матеріали XII Українського біохімічного конгресу*, 30 вересня – 4 жовтня 2019, м. Тернопіль «Медична та клінічна хімія».-2019.-т. 21, 3(80), с. 232.

## АНОТАЦІЯ

**Павлова О.С. Ключові протеїни обміну тіаміну та функціональний стан нервових клітин при різній забезпеченості організму вітаміном.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.04 «Біохімія». - Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2019.

Дисертаційна робота присвячена з'ясуванню залежних від забезпеченості клітин тіаміном змін у стані протеїнів нервових клітин, що беруть участь в обміні тіаміну (тіамінпірофосфокіназа та транспортер тіаміну), та окремих нейроспецифічних протеїнів цитоскелету (гліальний фібрилярний кислий протеїн та триплет нейрофіламентів). У роботі продемонстровано, що авітаміноз, гіповітаміноз та хронічний алкоголізм характеризуються зниженням вмісту тіаміну у печінці та підтриманням максимально можливого рівня ТДФ у головному мозку, що свідчить про пріоритетність нервової тканини у розподілі тіаміну в організмі. Порівняльне дослідження Red-Ox балансу в тканині мозку при В<sub>1</sub>-авітамінозі і В<sub>1</sub>-гіповітамінозі свідчить, що обмежене але постійне надходження тіаміну попереджає розвиток ознак оксидативного стресу. Одноразове введення високої дози тіаміну щурам з аліментарним авітамінозом приводить до нормалізації загальних показників Red-Ox балансу в мозку. Підвищення вмісту THTR-1, яке відбувається на рівні експресії гену *slc19A2* у всіх досліджуваних відділах мозку за умов аліментарного авітамінозу, неможливо нівелювати введенням високої дози тіаміну. Хронічне споживання алкоголю призводить до зниження активності і вмісту як THTR-1 так і ТПК у корі великих півкуль, мозочку та гіпокампі щурів. Зміни в стані транспортера тіаміну (THTR-1) і тіамінпірофосфокінази (ТПК) за умов В<sub>1</sub> гіпо- та авітамінозу протилежно спрямовані, що свідчить про спряженість їх функціонування у клітинах. Встановлено, що за умов ТД відбувається збільшення асоціації ТПК з плазматичною мембраною. Введення високої дози тіаміну до ТД клітин приводить до рівномірного перерозподілу протеїну у клітині. За всіх досліджуваних ТД станів спостерігається зниження вмісту GFAP. Ці зміни зворотні, про що свідчить підвищення вмісту протеїну при одноразовому введенні вітаміну. При хронічному алкоголізмі коригуюча дія вітаміну можлива лише за умов сумісного введення з Метовітаном. Зниження вмісту триплета нейрофіламентів (NF) спостерігаються тільки за умов глибокого аліментарного



авітамінозу. При введенні тіаміну, у першу чергу, відновлюється рівень триплету, тоді як вміст GFAP підвищується лише частково, що свідчить про пріоритетність нейронів при розподілі тіаміну у головному мозку. Отримані в дисертаційній роботі експериментальні результати мають важливе значення для медичної біохімії, фармакології, токсикології та медицини, оскільки розширюють сучасні уявлення про клітинно-молекулярні особливості розвитку тіамін-дефіцитних станів. Продемонстрована відновлювальність нейроспецифічних структур цитоскелету, пригнічених за умов ТД станів, є підставою для науково обґрунтованих практичних рекомендацій щодо доцільності використання запропонованої комбінації препаратів (висока доза тіаміну та препарат Метовітан) для профілактики та/або лікування нейродегенеративних патологій, які індукуються або супроводжуються дефіцитом тіаміну.

**Ключові слова:** вітамін В<sub>1</sub>, тіамін, дефіцит тіаміну, авітаміноз В<sub>1</sub>, гіповітаміноз В<sub>1</sub>, алкоголізм, нейродегенеративні захворювання, транспортер тіаміну THTR-1, тіамінпірофосфокіназа, гліальний фібрилярний кислий протеїн (GFAP), нейрональний цитоскелет, триплет нейрофіламентів (NF).

### Abstract

***Pavlova O.S. Key proteins of thiamine metabolism and functional state of nerve cells with different supply of organism with the vitamin.***

Thesis for PhD's degree by speciality – 03.00.04 «Biochemistry». – Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019. The thesis is dedicated to the analysis of changes in the state of thiamine pyrophosphokinase and thiamine transporter and neurospecific proteins of the cytoskeleton dependent on thiamine supply.

It has been found that the increase in THTR-1 content, which occurs at the *slc19a2* gene expression level in all investigated brain regions under conditions of alimentary avitaminosis, cannot be offset by a single administration of a high thiamine dose. It has been established that under В<sub>1</sub>-avitaminosis condition there was both the enzyme activity and the protein decreases. It has been shown that under the conditions of chronic alcoholic intoxication there is a decrease in the TPK protein content in all studied brain sections and decreased enzyme activity in the brain. The increased astrocytes sensitivity to TD of varying degrees has been confirmed - even with limited thiamine admission, GFAP inhibition is observed. However, these changes are reversible, as evidenced by an increase in protein content caused by one-time administration of vitamin. Changes in the neurofilaments level are observed only under conditions of deep alimentary avitaminosis, and the decrease in protein content occurs only in cerebellum. However, the thiamine administration reduces these changes and even stimulates the increase in the NF content. These data demonstrate the priority of neurons in the distribution of thiamine in the brain. In case of chronic alcoholism, the normalization of the indicators was possible only with the co-administration of thiamine with the Metovitan drug. The renewal of neurospecific

cytoskeleton structures suppressed under conditions of TD states is a basis for scientifically substantiated practical recommendations on the feasibility of using the proposed drug combination (a high thiamine dose and drug Metovitan) for the prevention and / or treatment of neurodegenerative pathologies induced or accompanied by thiamine deficiency.

**Key words:** vitamin B<sub>1</sub>, thiamine, thiamine deficiency, vitamin B<sub>1</sub> avitaminosis, vitamin B<sub>1</sub> hypovitaminosis, alcoholism, neurodegenerative diseases, thiamine THTR-1 transporter, thiamine pyrophosphokinase, glial fibrillar acidic protein (GFAP), neuronal cytoskeleton, Neurofilaments Triplet (NF).