

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ імені О.В.ПАЛЛАДИНА

*На правах рукопису*

*ПРОТАСОВА ЗОЯ СТЕПАНІВНА*

***Вивчення взаємодії тіаміну з нервовими  
закінченнями мозку щурів***

03.00.04 - Біохімія

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

**Київ - 1997**

Дисертація  
Робота виконана  
біохімії

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00752739 (X)

ІНСТИТУТУ

Науковий керівник - доктор біологічних наук ,  
член-кореспондент НАН України,  
Донченко Георгій Вікторович

Офіційні опоненти : доктор біологічних наук  
Малишева Маргарита Костянтинівна,  
доктор біологічних наук  
Тугай Василь Андрійович.

Провідна організація - Національний медичний університет  
ім.О.О. Богомольця

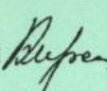
Захист відбудеться " 23 " червня 1997р.

о 12<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради  
Д 01.84.01 в Інституті біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України  
(252601, Київ-30, вул.Леонтовича, 9)

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту  
біохімії НАН України.

Автореферат розісланий "22 " травня 1997 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради  О.В.Кірсенко

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Численні дослідження свідчать про високу нейроактивність тіаміну (вітаміну В<sub>1</sub>) та зв'язок поміж порушенням його обміну і захворюваннями нервової системи (Murphy, 1976; Itokava, 1977; Haas, 1988; Cold, 1995).

Сформульовано ряд гіпотез щодо особливої ролі тіаміну в функціонуванні нервової системи. Результати електрофізіологічних досліджень, проведених на нервово-м'язових препаратах, стали основою для формулювання гіпотези щодо можливої участі вітаміну В<sub>1</sub> в функціонуванні нервових клітин на рівні збудливих мембран (Muralt, 1958; Binet, Minz, 1960). Було показано ефект тіаміну та його похідних у функціонуванні Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-ази, Na<sup>+</sup> каналів, Cl<sup>-</sup> каналів (Shoffeniels, 1984; Takenaka, 1980; Bettendorf, 1987, 1988, 1990, 1994).

Зроблено спробу пов'язати високу нейроактивність тіаміну з його коферментною функцією у пірватдегідрогеназній реакції, що забезпечує синтез ацетильного компоненту для нейромедіатора ацетилхоліну (АХ) (Peters 1967). Однак ця гіпотеза не одержала підтримки тому, що при деяких захворюваннях нервової системи не виявлено змін в активності тіаміндіфосфатзалежних (ТДФ-залежних) ферментів. Так, перебіг хвороби Лея (зверхнекротизуючої енцефаломієлопатії) супроводжується порушенням синтезу трифосфорного ефіру тіаміну через індукцію синтезу в клітинах мозку хворих дітей білкового інгібітора тіамінпірофосфокінази (Cooper et al., 1969). Продемонстровано зв'язок дефектів обміну вітаміну В<sub>1</sub> та структури ТДФ-залежного ферменту - пірватдегідрогеназного комплексу (ПДК, КФ 1.2.4.2.) в мозку - з порушеннями функціонування нервової системи (Evans et al., 1981, Robinson et al., 1987).

Ряд експериментальних результатів дозволяє розвинути гіпотезу Петерса з позицій некоферментної дії фосфорних ефірів тіаміну на рівні регуляції синтезу чи обміну АХ. В аспекті проблеми, яка

розглядається, найважливішими є наступні дані: 1) відкриття механізму регуляції ПДК шляхом фосфорилювання-дефосфорилювання (Reed, 1969), 2) експериментальні підтвердження переважного використання пірувату в синтезі АХ (Lefresne et al., 1978; Perry et al., 1980), 3) докази чіткої спряженості регуляції ПДК за механізмом фосфорилювання-дефосфорилювання з функціонуванням збудливої мембрани (Browning et al., 1981; Schaffer & Olson, 1980), 4) виявлення участі тіамінфосфатів у регуляції ПДК (Пархоменко, Протасова 1986).

Оскільки жодна з наведених гіпотез окремо не спроможна пояснити високу нейроактивність тіаміну, ми застосували інтегральний підхід для з'ясування механізмів реалізації специфічної нейротропної дії тіаміну: з одного боку, ми досліджували безпосередню взаємодію тіаміну та його фосфатів зі збудливими мембранами, з другого - вплив біологічно активних похідних тіаміну на функціонування нервових закінчень, опосередкований їх дією на метаболічні процеси.

### **Мета роботи і завдання.**

Основною метою роботи було вивчення особливостей обміну тіаміну та його біологічно активних похідних - тіамінфосфатів в нервових закінченнях та з'ясування ролі тіамінфосфатів у функціонуванні нервових клітин. Відповідно до цього були поставлені такі **завдання**:

1. Вивчити фізико-хімічні характеристики взаємодії тіаміну і його фосфатів з синапсоматомами і їх плазматичними мембранами та природу тіамінзв'язуючих ділянок на мембранах.
2. Дослідити транспорт і перетворення [<sup>14</sup>C] тіаміну синапсоматомами, а також вивчити локалізацію ферментів синтезу і деградації тіамінфосфатів у нервових закінченнях.
3. З'ясувати роль окремих функціональних груп молекули тіаміну в його специфічній взаємодії з мембранами нервових клітин.

4. Дослідити участь тіаміну та його біологічно активних метаболітів у функціонуванні нервових клітин.

**Положення , що виносяться на захист.**

1. Транспорт тіаміну через плазматичну мембрану нервових закінчень здійснюється за допомогою переносника білкової природи, який є структурно-специфічним до молекули тіаміну.

2. Процеси синтезу та гідролізу тіамінтрифосфату (ТТФ) і тіаміндифосфату (ТДФ) чітко розділені в компартментах нервового закінчення : ТДФ і ТТФ синтезуються в цитозолі; гідроліз ТДФ найактивніше відбувається в мітохондріях, а ТТФ - в синаптичних везикулах та плазматичній мембрані.

3. В нервових клітинах, крім метаболічного пулу тіаміну, є рухомий пул, що циркулює через мембрану і спряжений з функціонуванням збудливих мембран.

4. Тіамін бере участь в регуляції синтезу ацетилхоліну з пірватату шляхом впливу його фосфорильованих похідних на синтез ацетильного компоненту.

**Теоретичне та практичне значення роботи.** Одержані дані поглиблюють розуміння молекулярних механізмів реалізації біологічної функції вітаміну В<sub>1</sub> і його фосфорних ефірів у нервових клітинах, обмін якого (поглинання, фосфорилування-дефосфорилування, вивільнення) спряжений з функціонуванням збудливих мембран. Експериментально обґрунтовано наявність рухомого пулу вітаміну В<sub>1</sub> в нервових клітинах. Результати роботи дозволяють охарактеризувати етапи обміну тіаміну в нервовій клітині: поглинання, транспортування через плазматичну мембрану, фосфорилування-дефосфорилування в клітині, дефосфорилування при деполяризації мембрани і вивільнення тіаміну з нервових закінчень, а також виявити компартменталізацію процесів синтезу і гідролізу фосфорних ефірів тіаміну (ФЕТ) в нервових клітинах. На основі дослідження механізмів взаємодії тіаміну

з синапсосомами і взаємозв'язку обміну тіаміну з функціонуванням нервової клітини сформульовано гіпотезу стосовно механізму нейротропної дії вітаміну В<sub>1</sub>. Результати дослідження впливу структурних тiazолієвих аналогів на синтез АХ обґрунтовують доцільність пошуку нових нейроактивних сполук, похідних вітаміну В<sub>1</sub>, що можуть бути перспективними для використання у клініці.

**Новизна роботи.** Показано наявність на синаптичних мембранах ділянок білкової природи, які специфічно зв'язують тіамін ( $K_d = 3,1 \mu\text{M}$ ), вивчені кінетичні закономірності взаємодії тіаміну з відповідними ділянками плазматичних мембран та оцінено внесок окремих фрагментів молекули тіаміну у цей процес. Вперше експериментально обґрунтовано припущення, що ділянки, які специфічно зв'язують тіамінфосфати, локалізовані на внутрішній поверхні плазматичної мембрани нервових закінчень. Вивчено розподіл в нервових закінченнях ферментів, що гідролізують тіамінфосфати. Зокрема, найвища тіамінтрифосфатазна (ТТФ-азна) активність виявлена в синаптичних везикулах та плазматичних мембранах синапсосом - структурах, з якими пов'язана нейромедіаторна функція нервових клітин. Обґрунтовано наявність рухомого пулу тіаміну в нервових закінченнях та його зв'язок з обміном АХ.

**Апробація роботи.** Матеріали дисертації доповідались і обговорювались на X об'єднаному симпозиумі біохімічних товариств СРСР-НДР (Ташкент, 1989), на Всесоюзній конференції по клінічній вітамінології (Москва, 1991), VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992); на 16 міжнародному біохімічному конгресі (Нью Делі, 1994), на конференціях молодих вчених, семінарах Інституту біохімії ім.О.В. Палладіна НАН України.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається з вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження,

результатів та їх обговорення, заключення, висновків, списку літератури (270 джерел). Робота викладена на 115 сторінках машинопису, вміщує 23 рисунки, 4 таблиці.

**Особистий внесок дисертанта** полягає у виконанні експериментальної частини роботи, підборі та обробці літературних даних. Аналіз та обговорення проведено спільно з науковим керівником. Друковані праці підготовлені за безпосередньою участю автора.

## **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

Дослідження проводили на щурах (самцях) лінії Вістар масою 150-180 г. Після декапітації брали головний мозок (півкулі, гіпоталамус, мозочок) і виділяли синапсоми методом диференційного центрифугування та центрифугуванням в градієнті концентрації сахарози за методом (Abita et al., 1977). Контроль чистоти субклітинних фракцій здійснювали за активністю маркерних ферментів та за допомогою електронної мікроскопії (Henn et al., 1982).

Включення тіаміну вивчали в інкубаційному середовищі, що вміщувало: бікарбонатний Кребс-Рінгерівський буфер pH 7,4; 125 мМ NaCl; 4,5 мМ KCl; 2,5 мМ CaCl<sub>2</sub>; 1,3 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,3 мМ MgSO<sub>4</sub>; 17,6 мМ NaHCO<sub>3</sub>; 5·10<sup>-4</sup> М IMP; 10 мМ глюкозу. Об'єм проби 0,2 - 0,5 мл.

При вивченні включення [<sup>14</sup> C]тіаміну його концентрація в інкубаційному середовищі становила від 2 до 10 мкМ. Синапсоми (С) або плазматичні мембрани синапсом (ПМС) додавали в пробу з розрахунку 0,5 мг білка на 1 мл. Інкубацію проводили при 37 °С та безперервному перемішуванні. Для визначення неспецифічного зв'язування ставили контрольні проби з додаванням в інкубаційне середовище 100-кратного надлишку неміченого тіаміну. Специфічне зв'язування визначали за різницею між загальним зв'язуванням і неспецифічним. Зв'язування зупиняли внесенням 2мл охолодженої до

0 °C інкубаційної рідини, без тіаміну і швидким наступним розділенням на мембранних фільтрах GF/C "Whatman". На фільтрах проби двічі промивали 2 мл охолодженої до 0 °C інкубаційної суміші без тіаміну. Радіоактивність вимірювали на сцинтиляційному лічильнику LS-700 Beckman. Роль окремих фрагментів в молекулі тіаміну у взаємодії [<sup>14</sup>C] тіаміну з плазматичними мембранами синапсом вивчали за допомогою його похідних, фосфатів, синтезованих солей тiazолія методом конкуренції. Здатність інгібувати включення [<sup>14</sup>C] тіаміну порівнювали з таким же показником для неміченого ліганду. Концентрація тіаміну складала 2,5 мкМ, концентрація похідних і фосфорних ефірів -10-40мкМ.

Дослідження внутрішньоклітинного вмісту тіаміну та ФЕТ. Синаптосоми інкубували з [<sup>14</sup>C] тіаміном, відділяли центрифугуванням, промивали сахарозою, екстрагували ТХО, етиловим ефіром, концентрували розчин на роторному випарювачі. Сухий залишок розчиняли в мінімальній кількості води і додавали немічені похідні тіаміну як свідки. Мічені ФЕТ визначали електрофоретично на смужках ацетат целюлозної плівки.

Визначення активності ТДФ-кінази проводили за участю [<sup>32</sup>P]АТФ (Черникевич и др.,1982). Мічений ТТР визначали електрофоретично. Ферментативну активність в реакціях гідролізу тіамінфосфатів визначали за кількістю утворення неорганічного фосфору (Chan et al.,1986), тіамінтрифосфатазну активність додатково визначали за допомогою ферментативного методу (Черникевич, 1989). Тіамінтрифосфат синтезовано за методом (Pentinen,1979). Електрофорез ФЕТ на плівках ацетат целюлози проводили за розробленим нами методом (Parchomenko et al.,1979). Включення міченого вуглецю із [2-<sup>14</sup>C] пірувату в АХ визначали радіометрично після осадження із інкубаційного середовища синтезованого АХ у вигляді періодату

(Fonnum et al., 1975). Білок вимірювали за методами Бредфорда (Bradford, 1981) та Лоупі (Lowry, 1951).

Тетрагідротіамін синтезовано співробітниками Інституту біохімії АН Білорусі. Інші похідні тіаміну та солі тiazолія були надані співробітником ІБОНХ НАН України д.х.н. А.І. Вовком.

Статистична обробка даних проведена загальноприйнятими методами варіаційної статистики (Плохинский, 1981).

## **РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

### **1. ВЗАЄМОДІЯ [<sup>14</sup>C]ТІАМІНУ З ПРЕПАРАТАМИ ІЗОЛЬОВАНИХ СИНАПТОСОМ І СИНАПТИЧНИХ МЕМБРАН.**

З метою з'ясування кінетичних і фізико-хімічних характеристик взаємодії тіаміну з нервовими закінченнями нами досліджено включення тіаміну в нативні препарати синапсосом та їх плазматичних мембран.

Одержані дані свідчать, що включення міченого тіаміну в С і ПМС відбувається досить швидко (рівновага досягається через 2 хв.),  $K_a$  дорівнюють, відповідно,  $1,16 \pm 0,14 \text{ хв}^{-1}$  та  $1,04 \pm 0,6 \text{ хв}^{-1}$ .

Включення [<sup>14</sup>C] тіаміну в препарати синапсосом демонструє рис.1. Було показано, що включення міченого тіаміну в С і ПМС залежить від температури інкубації. Оптимальне включення відбувається при  $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Дані про вплив окремих іонів на включення [<sup>14</sup>C] тіаміну в мембрани синапсосом свідчать, що його поглинання суттєво залежить від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  (внесення ЕГТА знижує включення на 50%) і не залежить від наявності іонів  $\text{Na}^+$ .

Дослідження з використанням інгібіторів окремих ланок енергетичного метаболізму (рис.2) показали, що при фізіологічних концентраціях тіаміну ( $2,5 \text{ мкМ}$ ) їх вплив на включення тіаміну в синап-

тосами відрізняється мало і зводиться до зниження включення в середньому на 25- 30%.

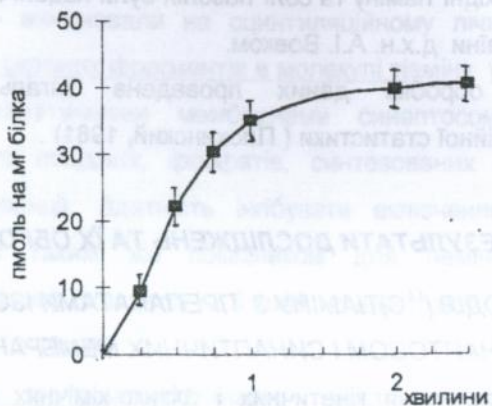


Рис. 1. Динаміка включення [<sup>14</sup>C] тіаміну в синаптосоми при фізіологічній концентрації (2,5 мкМ).

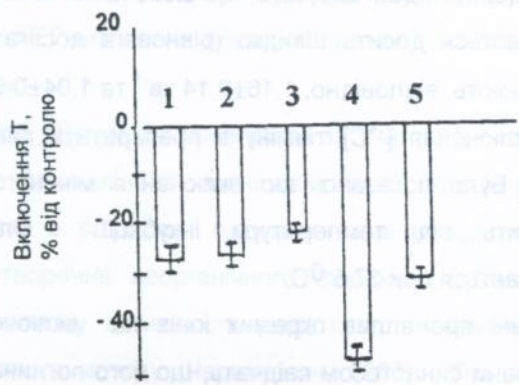


Рис.2. Вплив інгібіторів енергетичного метаболізму на включення [<sup>14</sup>C] тіаміну в синаптосоми. Внесені відповідно: 1 - азид натрію; 2 - 2,4-динітрофенол; 3 - натрій фторид; 4 - парахлормеркурійбензоат; 5 - бензол-1,2,3-трикарбонова кислота. Час інкубації 2,5 хв; конц. тіаміну 2,5мкМ ; % від контролю. (n=4-5)

При високих концентраціях тіаміну вплив інгібіторів на включення зменшується, що може вказувати на перевагу пасивного транспорту над опосередкованим транспортом тіаміну за цих умов.

В окремих експериментах досліджено вплив нейротоксинів - природних блокаторів іонних каналів - на включення тіаміну в нативні синаптосоми і препарати мембран синапсом. Дані, представлені в табл.1., свідчать, що оуабайн, блокатор  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-ази, знижує включення тіаміну у синаптосоми при обох використаних концентраціях. Менший ефект спостерігався на препаратах ПМС. Тетродотоксин не впливає на включення [ $^{14}\text{C}$ ] тіаміну в С і ПМС, а латротоксин знижує включення приблизно на 32% в синаптосоми і не впливає на включення в ПМС.

Таблиця 1.

Дія нейротоксинів і оуабайну на включення [ $^{14}\text{C}$ ] тіаміну препаратами С та ПМС. Концентрація тіаміну 1мкМ, n=6, p<0,05.

Використаний нейротоксин	Включення [ $^{14}\text{C}$ ] тіаміну, % від контролю	
	Синаптосоми	Мембрани
Вератридин		
30 мкМ	16,2±6,7*	118,5±8,8
60 мкМ	24,7±8,5*	
Тетродотоксин		
0,2 мкМ	82,3±15,3	96,7±15,1
1,0 мкМ	120,2±31,4	115,6±22,3
Оуабайн		
25 мкМ	74,6±19,9	80,8±5,4*
50 мкМ	57,3±11,9*	83,9±5,0*
Латротоксин		
0,08 мкМ	67,9±10,6*	97,9±18,9

\*-значення достовірні в порівнянні з контролем

Найбільше знижував включення ліганду в синаптосоми (максимально на 80%) вератридін, однак на мембранах він виявився неефективним. Вератридін є сильно діючим деполяризуючим агентом, тому останнє спостереження може вказувати на залежність здатності синаптосом поглинати тіамін від заряду мембрани.

Результати дослідження концентраційної залежності включення [ $^{14}\text{C}$ ] тіаміну в мембрани синаптосом наведені на рис. 3. Вони свідчать, що поглинання тіаміну мембранами синаптосом має двофазний характер: перша фаза - при концентраціях тіаміну від  $1 \cdot 10^{-8}$  до  $1 \cdot 10^{-5}$  М, друга - починається при концентрації вищій за  $1 \cdot 10^{-5}$  М і характеризується крутим підйомом.

Ці дані узгоджуються з літературними, що їх одержано на інших об'єктах, зокрема, на препаратах слизової оболонки шлунку (Rindi et al., 1972) і мікроорганізмах (Takashi, 1983). Очевидно, що двофазність пов'язана із зміною механізмів поглинання тіаміну: при низьких концентраціях - превалює активний процес, а при високих - пасивний транспорт тіаміну, що є неспецифічним процесом.

Для з'ясування характеру включення тіаміну в синаптосоми та плазматичні мембрани ми використали методичний підхід витіснення [ $^{14}\text{C}$ ] тіаміну, що включився в синаптосоми та ПМС, високими концентраціями неміченого ліганду (рис.4). Дані свідчать, що в перші 2,5 - 5 хв включення основної кількості тіаміну препаратами синаптосом є зворотнім, однак довготриваліша інкубація спричиняє транспортування тіаміну всередину синаптосом та його фосфорилування.

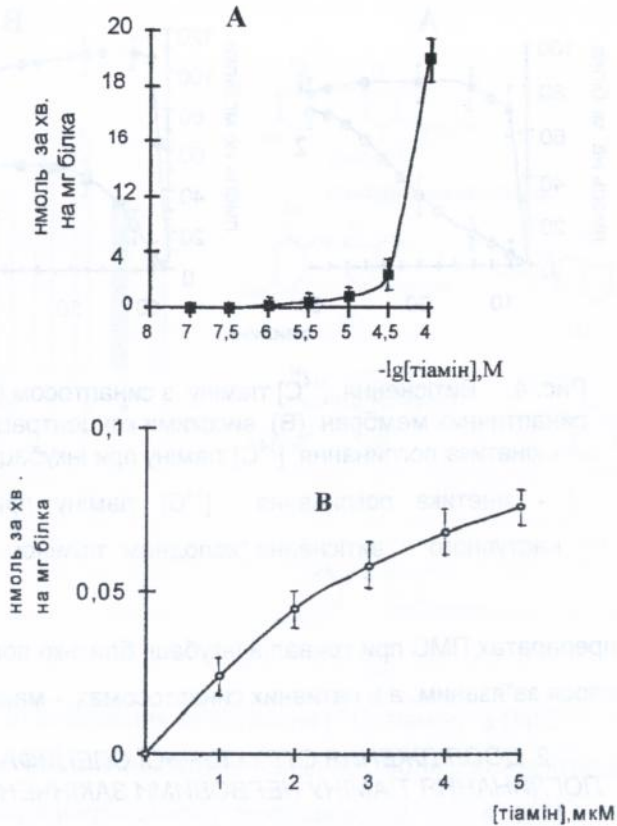


Рис.3. Концентраційна залежність включення міченого тіаміну в синаптосоми:

**А** - діапазон концентрації тіаміну  $1 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-4}$ М;

**В** - концентрація тіаміну 0-5 мкМ. Умови інкубації: час - 2,5 хв; - 37 °С; - 0,5 мг білку в 1мл середовища. Кожна точка є середнім 3-5 дослідів.

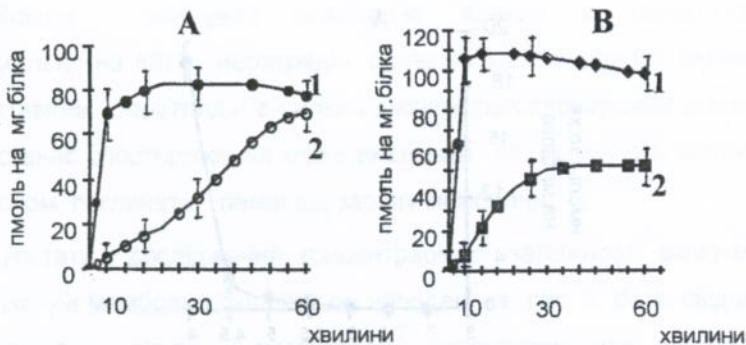


Рис. 4. Витіснення  $[^{14}\text{C}]$  тіаміну з синапсомом (А) і синаптичних мембран (В) високими концентраціями тіаміну. 1 - кінетика поглинання  $[^{14}\text{C}]$  тіаміну при інкубації; 2 - кінетика поглинання  $[^{14}\text{C}]$  тіаміну при інкубації та наступного витіснення "холодним" тіаміном.

В препаратах ПМС при тривалій інкубації близько половини ліганду залишалось зв'язаним, а в нативних синапсомомом - майже весь.

## 2. ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРНОЇ СПЕЦИФІЧНОСТІ ПОГЛИНАННЯ ТІАМІНУ НЕРВОВИМИ ЗАКІНЧЕННЯМИ.

Щоб з'ясувати роль окремих функціональних груп в молекулі тіаміну при його взаємодії з ПМС ми застосували принципи конкурентного аналізу, використовуючи ряд структурних аналогів вітаміну  $\text{B}_1$  (рис.5).

Перша серія дослідів була проведена на препаратах ПМС з використанням таких сполук: окситіаміну (заміна  $\text{NH}_2$ -групи на  $\text{OH}$ -групу), піритіаміну (заміна тiazолієвого циклу на піримідинієвий), тетрагідротіаміну (насичене тiazолове кільце). Концентрація похідних змінювалась від  $1 \cdot 10^{-6}$  до  $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ . Дані, наведені на рис.5., свідчать, що жодна з використаних в досліді речовин не здатна конкурувати за поглинання з міченим тіаміном такою ж мірою, як сам немічений тіамін.

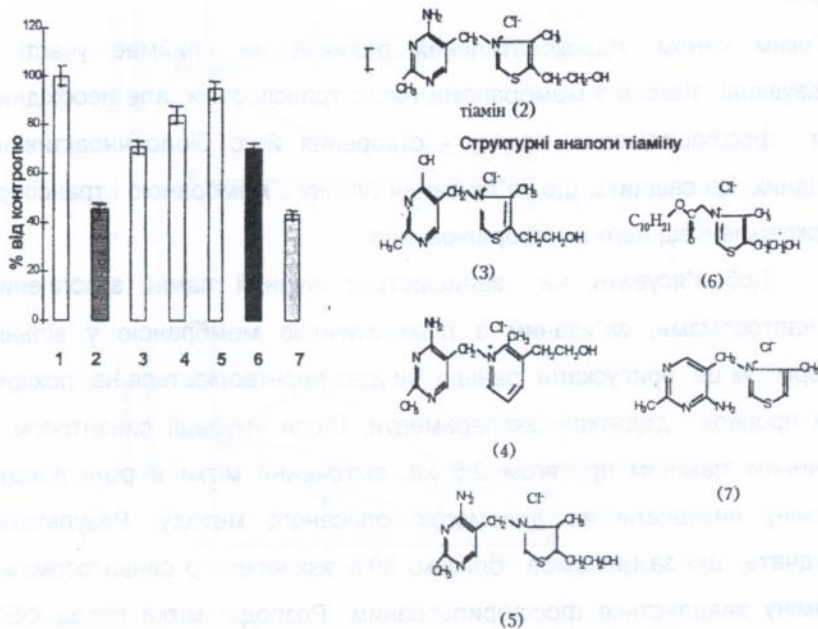


Рис. 5. Інгибування зв'язування [<sup>14</sup>C] тіаміну з ПМС структурними аналогами (% від контролю). Концентрація [<sup>14</sup>C] тіаміну в інкубаційному середовищі -  $2 \cdot 10^{-6}$  -  $4 \cdot 10^{-6}$  М.

1 - контроль (мічений тіамін); разом з міченим тіаміном введені відповідно: 2 - тіамін; 3 - окситіамін; 4 - піритіамін; 5 - тетрагідротіамін; 6 - 3-децилоксикарбонілметил-4-метил-5-β-гідроксиетилтіазолій хлорид; 7 - 3-(2-метил-4-амінопіримідиніл-5)-метил-4-метилтіазолій хлорид.

Тобто, для зв'язування тіаміну з мембранами синапсомом важливою є цілісність його природної структури.

Роль гідроксиетильного радикалу у взаємодії тіаміну з синапсомом вивчали за допомогою його аналога без гідроксиетильного радикалу в положенні 5 тіазолієвого циклу (сполука 7, рис 5). Ця сполука не здатна фосфорилуватись тіамінкіназою, яка локалізована в цитозолі,

але інгібує включення мітки в синаптосоми майже в такій мірі як сам тіамін.

Таким чином, гідроксиетильний радикал не приймає участі у зв'язуванні тіаміна з мембранами і його транспортом, але необхідний для фосфорилування тіаміну - створення його біологічноактивних похідних. Це свідчить, що зв'язування тіаміну з мембраною і транспорт відокремлені від його фосфорилування.

Щоб з'ясувати, чи залишається мічений тіамін, захоплений синаптосомами, зв'язаним з плазматичною мембраною у вільній формі, як це припускали раніше, чи далі перетворюється на похідні, ми провели додаткові експерименти. Після інкубації синапсом з міченим тіаміном протягом 2,5 хв. включення мітки в різні похідні тіаміну визначали за допомогою описаного методу. Результати, свідчать, що за цих умов близько 80% захопленого синаптосомами тіаміну виявляється фосфорильованим. Розподіл мітки серед ФЕТ після інкубації синапсом з [ $^{14}\text{C}$ ] тіаміном ( 2,5 мкМ) був таким: ТМФ - 16,8 %; ТДФ - 21,5 %; ТТФ - 41,5 % , тіаміну - 20,3 %. Загальна кількість [ $^{14}\text{C}$ ] тіаміну становила  $42,5 \pm 3,2$  пмоль/ мг білка ( умови інкубації:  $-37^\circ\text{C}$ , t-2,5 хв ).

Припускається, що в реалізації нейротропної дії тіаміну основна роль належить тіамінфосфатам, що є біологічно активними похідними тіаміну. Тому ми врахували за необхідне дослідити їх здатність зв'язуватися з плазматичними мембранами нервової клітини та проникати через неї.

За методом конкурентного аналізу досліджено здатність тіамінфосфатів впливати на включення тіаміну в синаптосоми і плазматичні мембрани синапсом. Як показано на рис.7., жоден з ФЕТ не конкурує з тіаміном при взаємодії з препаратами синапсом.

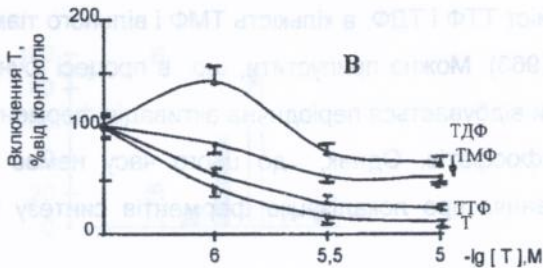
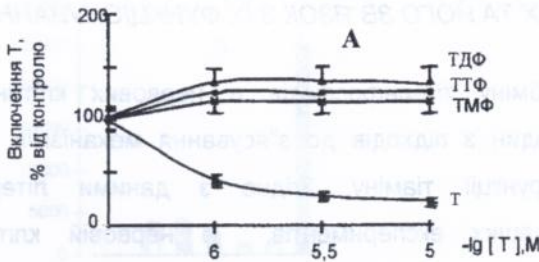


Рис.7. Включення [<sup>14</sup>C]тіаміну в синаптосоми (А) і плазматичні мембрани синаптосом (В) за наявності тіаміну та його фосфатів. (За 100% взято включення [<sup>14</sup>C] тіаміну без додавання тіаміну та тіамінфосфатів).

Вартий уваги той факт, що при взаємодії фосфорних ефірів тіаміну з ПМС конкуруюча дія ТТФ практично не відрізняється від впливу самого неміченого тіаміну. Отже ТТФ успішно конкурує з тіаміном за зв'язування із специфічними ділянками на плазматичній мембрані синаптосом і нездатний зв'язуватися з синаптосомами. Детальніше дослідження кінетики взаємодії цієї сполуки з ПМС показало, що Кд для ТТФ дорівнює 1мкМ, тоді як Кд для Т дорівнює 3мкМ. Вищенаведені дані свідчать, що внутрішня поверхня плазматичної мембрани синаптосом зв'язує ТТФ специфічніше, ніж тіамін.

### 3. ВИВЧЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ОБМІНУ ТІАМІНУ В НЕРВОВИХ КЛІТИНАХ ТА ЙОГО ЗВ'ЯЗОК З ЇХ ФУНКЦІОНУВАННЯМ.

Вивчення обміну тіамінфосфатів в нервових клітинах можна розглядати як один з підходів до з'ясування механізмів реалізації нейротропної функції тіаміну. Згідно з даними літератури та результатами наших експериментів в нервовій клітині тіамін представлений переважно фосфорними ефірами, головним чином - ТДФ і частково ТТФ і ТМФ (Островский, 1971). При збудженні значно зменшується вміст ТТФ і ТДФ, а кількість ТМФ і вільного тіаміну зростає (Cooper et al., 1963). Можна припустити, що в процесі функціонування нервової клітини відбувається періодична активація ферментів синтезу і гідролізу тіамінфосфатів. Однак, до цього часу немає задовільної ясності в уявленнях про локалізацію ферментів синтезу і деградації тіаміну.

Оскільки чутливість існуючих методів визначення вмісту окремих фосфатів тіаміну обмежена, ми визначали в субсинапсомальних фракціях активність ферментів синтезу і деградації тіамінфосфатів, приділяючи особливу увагу ферментам обміну ТТФ, з яким пов'язують нейротропну дію тіаміну. З'ясувалось (рис.7), що синтез ТТФ із  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}]$  (а значить і ТДФ, який є субстратом для ТДФ-кінази (КФ 2.7.4.15)) найактивніше здійснюється фракцією гладенького ретикулу, що виділяється разом з мієліном, і меншою мірою - мітохондріями. Практично відсутній синтез ТТФ у фракції плазматичних мембран синапсом.

Разом з тим, лужна  $\text{Mg}^{2+}$ -залежна ТТФ-азна (КФ 3.6.1.28) активність, що вимірювалась за утворенням ТДФ ферментативним методом, є найбільшою в плазматичних мембранах синапсом і синаптичних везикул (рис.7). В фракції гладенького ретикулу і мітохондріях виявлені лише сліди цієї активності.

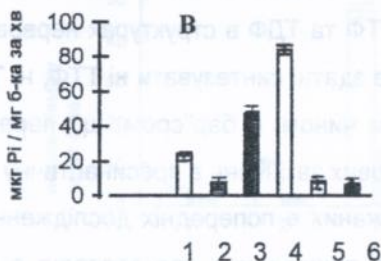
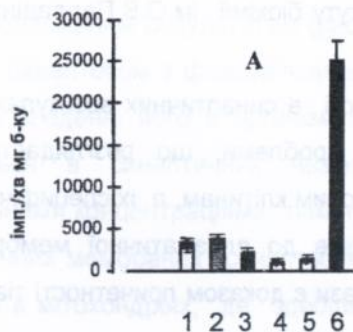


Рис.7. Розподіл активності ферментів обміну ТТФ: ТДФ-кінази (А) і ТТФ-ази (В) в субклітинних фракціях мозку щурів; 1 - гомогенат; 2 - загальна фракція мітохондрій, 3 - синаптосоми; 4 - мембрани синаптосом; 5 - мітохондрії синаптосом; 6 - міелін+гладенький ретикулум.

Детальний скринінг активності ферментів, що гідролізують ТТФ,ТДФ і ТМФ показав, що максимальна ТТФ-азна активність, яка відповідає мембраноасоційованій ТТФ-азі (Barchi & Braun,1972,1976) з оптимумом рН 7,5, локалізована в плазматичних мембранах синаптосом і синаптичних везикулах, тоді як ТДФ-азна і ТМФ-азна активності найвищі в мітохондріях.

За цими ж параметрами (зв'язування тіаміну, його транспорту в нервову клітину, гідроліз ФЕТ) близьким до біологічних характеристик ПМС є тіамінз'язуючий білок (ТЗБ), що виділений і охарактеризований у

відділі біохімії коферментів Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАНУ (Постоєнко та інш.,1988).

Виявлення ТТФ-азної активності в синаптичних везикулах являє, без сумніву, інтерес в аспекті проблеми, що розглядається. Ці структури властиві виключно нервовим клітинам, а їх специфічна роль полягає в переносі нейромедіаторів до плазматичної мембрани. Їх активність в реакції гідролізу ТТФ-ази є доказом причетності тіаміну до обміну нейромедіаторів.

Таким чином, одержані дані свідчать про чітке розподілення ферментів синтезу і гідролізу ТТФ та ТДФ в структурах нервових закінчень. Плазматичні мембрани не здатні синтезувати ні ТТФ, ні ТДФ, але активно їх гідролізують і, таким чином, є бар'єром, що перешкоджає виходу фосфатів тіаміну з нервових закінчень в пресинаптичну щілину.

На основі результатів, одержаних в попередніх дослідженнях, і даних літератури, нами зроблено припущення про розподіл в синаптах двох пулів тіаміну : метаболічного, відносно стійкого, представленого ТДФ в складі ферментних білків і локалізованого в основному в мітохондріях, та значно рухливішого пулу, що циркулює через мембрани синаптосом синхронно зі зміною мембранного потенціалу, тобто з передачею нервового імпульсу.

Метою наступної серії дослідів було порівняння розподілу міченого тіаміну, захопленого нервовими закінченнями в дослідях *in vitro* і після його введення *in vivo*.

В першій серії дослідів тваринам внутрішньом'язево вводили мічений тіамін в дозі 1,5 мкмоль на 1кг, а через 30 хв. їх декапітували, виділяли синаптосоми, фракціонували їх на субклітинні фракції і досліджували вміст [<sup>14</sup>C] тіаміну (рис.8).

В другій серії дослідів ізольовані синаптосоми мозку щурів інкубували в середовищі при фізіологічній концентрації 2·10<sup>-6</sup> М [<sup>14</sup>C] тіаміну, протягом 2,5 хв.

Згідно одержаним результатам (рис.8) слід зазначити, що як при інкубації синаптосом з фізіологічними концентраціями [ $^{14}\text{C}$ ] тіаміну, так і при введенні його в організм *in vivo*, переважна його частина виявляється в синаптичних везикулах. При інкубації *in vitro* з фізіологічними концентраціями тіаміну значна частина зосереджена в плазматичних мембранах синаптосом, а при введенні тіаміну *in vivo* міститься в мітохондріях, де здебільшого локалізовані ТДФ-залежні ферменти.

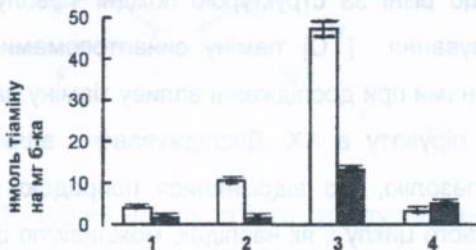


Рис.8. Розподіл по субфракціях [ $^{14}\text{C}$ ] тіаміну, захопленого синаптосомами в досліді *in vivo* - □ і *in vitro* - ■.  
1 - гл. ретикулум+ мієлін; 2 - мембрани синаптосом; 3 - синаптичні везикули; 4 - мітохондрії синаптосом.

Таким чином, мічений тіамін, захоплений синаптосомами в досліді *in vitro*, не залишається зв'язаним з мембранами синаптосом, а проникає в клітинні компартменти. Ці дані підтверджують висунуті нами припущення про існування в клітині двох пулів тіаміну,

Основною функцією нервової тканини є генерація і проведення нервового імпульсу, що забезпечується, зокрема, завдяки існуванню в нервових клітинах біохімічних систем, які здійснюють синтез та обмін нейромедіаторів. Тому ми перевіряли вплив тіаміну на синтез АХ. Виконані нами раніше дослідження показали, що зростання концентрації тіаміну в інкубаційному середовищі від 1 до 50 мкМ призводить до нелінійного інгібування включення в АХ міченого вуглецю із пірувату

(Parkhomenko, Protasova, 1991). За цих же умов загальна активність ПДК, так само як і активність першого ферменту комплексу, змінюється синхронно зі зміною включення мітки пірувату в АХ. Одержані результати свідчать про вплив тіаміну на синтез АХ на рівні синтезу його попередника - ацетил -CoA. За нашими припущеннями, тіамін виявляє тимчасову інгібуючу дію на активність ПДК, перетворюючись в клітині на ТТФ, який інгібує активність ПДГ-фосфатази і одночасно активує ПДГ-кіназу.

Було показано що різні за структурою похідні тіазолу по-різному впливають на зв'язування [ $^{14}\text{C}$ ] тіаміну синапсомами. Аналогічні підходи використані нами при дослідженні впливу тіаміну на включення радіомітки з [ $2\text{-}^{14}\text{C}$ ] пірувату в АХ. Досліджувався вплив різних за структурою солей тіазолію, що відрізнялися природою замісника в положенні 5 тіазолієвого циклу і, як наслідок, можливістю фосфорилюватися цитозольною тіамінпірофосфокіназою. Дію похідних тіаміну на синтез АХ вивчали при їх концентрації в діапазоні від 0,1 до 100 мкМ (рис.9). Результати такого дослідження для тіаміну (1), його аналога без 5- $\beta$ -гідроксиетильного радикалу (3), двох інших відповідних тіазолієвих структур (2,4) наведені на рис.9.

Отримані результати свідчать, що інгібування синтезу АХ із пірувату спостерігається тільки з похідними, що мають 5- $\beta$  - гідроксиетильний замісник.

Таким чином, вищенаведені результати досліджень свідчать, що подібно до самого тіаміну на синтез АХ впливають сполуки тіазолію, які мають гідроксиетильний радикал в положенні 5. Вони здатні проникати через плазматичну мембрану і, можливо, фосфорилюватися цитозольною тіамінпірофосфокіназою, чи взаємодіяти з цим ферментом, впливаючи на обмін тіамінфосфатів в клітині.

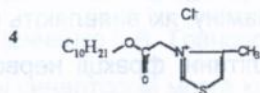
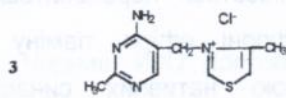
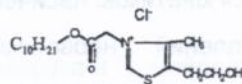
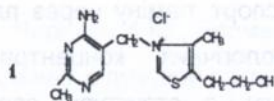
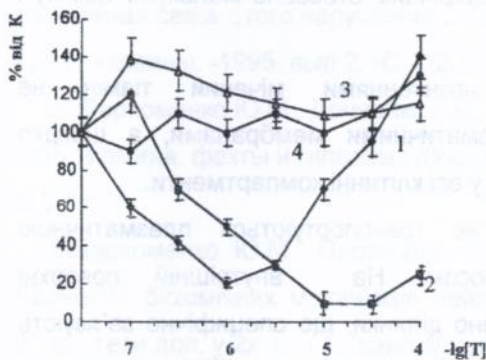


Рис.9. Вплив тіаміну та його структурних аналогів на включення радіомітки із [2-<sup>14</sup>C] пірувату в АХ.

1 - тіамін, 2 - 3-децилоксикарбонілметил-4-метил-5-β-гідроксиетилтіазолій хлорид, 3 - (2-метил-4-амінопіримідиній -5)метил-4 метил тіазолій хлорид; 4 - 3-децилоксикарбонілметил-4-метил-тіазолій хлорид.

Ці дані підтверджують наше припущення про те, що нейротропна дія тіаміну може бути пов'язана з його здатністю фосфорилуватись в клітині та наявністю некоферментного пулу ФЕТ, обмін якого спряжений з функціонуванням і метаболізмом нервової клітини.

## ВИСНОВКИ

1. Поглинання тіаміну ізольованими нервовими закінченнями мозку щурів при його фізіологічних концентраціях ( $1 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-5}$ М) є незалежним від наявності іонів  $Na^+$ , чутливим до дії інгібіторів метаболізму, температури та пригнічується деполаризуючими агентами (KCl, оубаїн, вератридин).

2. Транспорт тіаміну через плазматичні мембрани нервових клітин при фізіологічних концентраціях здійснюється за допомогою переносника і є структурно специфічним стосовно молекули тіаміну і описується кінетикою насичення.

3. Захоплений нервовими закінченнями мічений тіамін не залишається зв'язаним з плазматичними мембранами, а швидко фосфорилується і переноситься у всі клітинні компартменти.

4. Фосфорні ефіри тіаміну не транспортуються плазматичною мембраною нативних синапсом. На внутрішній поверхні плазматичної мембрани виявлено ділянки, що специфічно зв'язують фосфати тіаміну, які виявляють підвищену афінність до ТТФ ( $K_d=1\text{мкМ}$ ).

5. Субклітинні фракції нервових закінчень виявляють специфічність щодо гідролізу індивідуальних фосфорних ефірів. Найвища тіамінтрифосфатазна активність виявлена в синаптичних везикулах і плазматичних мембранах. Синаптичні везикули беруть участь у обміні тіаміну в нервових закінченнях.

6. Регулюючий вплив тіаміну на синтез ацетилхоліну із  $[2-^{14}\text{C}]$  пірувату обумовлений його здатністю фосфорилуватися в нервовій клітині.

### **ПЕРЕЛІК РОБІТ, ЩО ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Пархоменко Ю.М., Протасова З.С., Постоєнко В.О. Донченко Г.В. Локалізація ферментів синтезу і деградації тіамінтрифосфату в синапсомозку щурів//Доповіді АН УРСР. -1988. №8. -С.73-76.

2. Parkhomenko u.M., Protasova Z.S., Chernysh I.Yu. Phkakatze E.G. Donchenko G.V. Modification of acetylcholine synthesis in the rat brain synaptosomes by thiamine and its relation to the regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity/ /In book: Biochemistry and Physiology of ThDP-dependent enzymes. Proc.Int. meet., Weinheim-New York-Basel-Cambridge: VCH.-1991.- P. 375-380.

3. Пархоменко Ю.М., Протасова З.С., Черныш И.Ю., Еремеева М.Е. Нарушение обмена тиамин в крови больных с лучевой патологией и возможная связь этого нарушения с поражением нервной системы. //ДАН Украины. -1995. вып 2. -С.112-114.

4. Пархоменко Ю.М., Донченко Г.В., Протасова З.С. Нейроактивность тиамин: факты и гипотезы //Укр. биохим журн.-1996. -62, №2. - С.3-15.

5.Пархоменко Ю.М., Протасова З.С.,Черныш И.Ю.,Постоечко В.О. Вивчення біохімічних механізмів нейротропності тіаміну // Укр. біох. З'їзд, тези доп. у 2х ч., ч.1, Івано-Франківськ, 1987. - С.120-121.

6. Протасова З.С., Пархоменко Ю.М., Донченко Г.В. Транспорт тиамин через плазматические мембраны синапсом мозга крыс// Тез. док. X Объед.симп. биох.общ.СССР-ГДР, "Механизмы регуляции клеточной активности", Ташкент, 1989. -С. 62-63.

7.Протасова З.С., Пхакадзе Е.Г., Черныш И.Ю., Пархоменко Ю.М. Исследование тиаминтрифосфатазной активности тиаминсвязывающего белка.// Тез Всес. конф." Клиническая витаминология", Москва, 1991.- С.36.

8.Пархоменко Ю.М.,Протасова З.С.,Черныш И.Ю., Донченко Г.В. Особливості обміну тіаміну в нервових закінченнях мозку щурів.// VI Укр. біохім з'їзд, тези доп., ч.1, Київ, 1992.-С.134.

9.Parkhomenko Yu.M.,Yeremeyeva M.Ye.,Protasova Z.S.,Donchenko G.V. The new thiamine-binding(ThBP) from rat brain.// 16 th Intern. Congress of Biochem and Molec.Biology,New Deli, India, 1994, v. II.-P. 340.

**Protasova Z.S.** " Investigation of thiamine interaction with the rat brain nerve endings" (Manuscript).

The dissertation work for the degree of candidate of biological sciences (speciality: 03.00.04 - biochemistry). A.V. Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Science. Kyiv, 1997.

The work deals with investigation of thiamine neurotropic effect molecular mechanisms. Some peculiarities of thiamine metabolism in the nerve ending and its interaction with the nerve cell functioning have been estimated. The thiamine absorption at its physiological concentration by the isolated nerve endings was identified to be sensitive to the metabolism inhibitors, temperature, depolarizing agents and independent from  $\text{Na}^+$  ions.

The thiamine mobile pool presence in the nerve cell different from the metabolic pool and the thiamine phosphate ethers participation in acetylcholine regulation has been established.

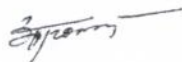
**Протасова З.С.** "Изучение взаимодействия тиамин с нервными окончаниями мозга крыс." (Рукопись)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04.- биохимия. Институт биохимии им.Палладина НАН Украины, Киев, 1997.

Работа посвящена изучению молекулярных механизмов нейротропного действия тиамин. Изучены особенности обмена тиамин в нервном окончании и их взаимосвязь с функционированием нервной клетки. Установлено, что поглощение тиамин изолированными нервными окончаниями при физиологических концентрациях чувствительно к действию ингибиторов метаболизма, температуры, деполаризирующих агентов и независит от ионов  $\text{Na}^+$ .

Обосновано наличие подвижного пула тиамин в нервном окончании, отличного от метаболического пула и участие фосфорных эфиров тиамин в регуляции синтеза ацетилхолин.

**Ключові слова:** тиамін, тиамінтрифосфат, синаптосоми, ацетилхолін, нейротропна функція тиаміну.



---

Підписано до друку 19.05.97р. Формат 60x84/16.  
Ум. друк. арк. 1,0. Обл.-вид. арк. 1,0.  
Наклад 100. Зам. 187.

---

Відділ оперативної поліграфії  
Центру Міжнародної освіти  
227-12-75, 227-37-86

437022

AB 37.906