

УДК 577.164.11 : 616.45-001/3-092

ПОКАЗАТЕЛИ ОБМЕНА ВИТАМИНА В₁ ПРИ СТРЕССЕИ.П. Черникевич¹, О.Н. Юзефович¹, Ю.А. Тарасов², Т.А. Урбаш³¹УО «Гродненский государственный медицинский университет»²Институт биохимии НАНБ, г. Гродно³УО «Гродненский государственный университет им. Я. Купаль»

При экспериментальном стрессе в начальной стадии резистентности суммарная концентрация тиамин-рибоса снижается незначительно, однако концентрация наиболее энергоёмкой фосфорилированной формы – тиаминтрифосфата, достигающая 13-14% от общего пула витамина, понижена почти наполовину. Изменения содержания кофермента – тиаминдифосфата не столь выражены. Снижение концентрации тиаминтрифосфата обусловлено активацией специфической тиаминтрифосфатазы. Предварительное введение стрессуемым животным тиаминтрифосфата существенно нивелирует отмеченные нарушения. Механизм адаптационного действия витамина опосредован и реализуется через усиление гормонообразовательной функции инсулоцитов.

Ключевые слова: тиамин, фосфорные эфиры тиамин, ферменты биотрансформации активных форм витамина В₁, стресс.

In experimental stress the total concentration of thiamine is slightly reduced in the initial stage of resistance, although the concentration of its more power-consuming phosphorylated form, thiamine triphosphate, making up 15% of the total pool of the vitamin is almost half reduced. The changes of coenzyme thiamine biphosphate content are not so considerable. The reduction of thiamine triphosphate concentration is due to activation of specific thiamine triphosphatase. The preliminary introduction of thiamine to animals under stress considerably levels these disorders. The mechanism of adaptative action of the vitamin is probably mediated and acts through the stimulation of hormonopoitetic function of insulocytes.

Key words: thiamine, phosphoric esters of thiamine, biotransformation enzymes of active forms of vitamin, stress.

Согласно существующим представлениям и проведенным ранее исследованиям защитное действие тиамин (витамина В₁) на стрессорные реакции базируется на допущении, что его коферментная форма – тиаминдифосфат (ТДФ) через стимуляцию окисления субстратов в пируват- и альфа-кетоглутаратдегидрогеназных реакциях цикла трикарбоновых кислот способен усиливать генерацию энергии в сердце, а через транскетолазу (ТК) может контролировать синтез рибозо-5-фосфата и восстановительных эквивалентов пентозофосфатного пути, необходимых для удовлетворения пластических нужд миокарда [1, 2], где, на фоне раздражающих факторов, уровень витаминов В-комплекса частично снижен [3]. Отсюда казалось логичным использовать тиамин прежде всего для профилактики недостаточности сердца в ситуациях, сопровождающихся компенсаторной гипертрофией миокарда, когда в органе резко усиливаются процессы энергопотребления и пластики. Однако посылка о возможности поддержания тиамином пластики в сердце через пентозофосфатный путь встречает возражения [4], поскольку в этом органе, из-за сравнительно малой мощности, данный путь не может рассматриваться как единственный, а тем более основной поставщик пентоз, необходимых для синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Миокард, по-видимому, удовлетворяет свои потребности в пентозах за счёт других факторов и (или) пищи. Установлено, что при гипертрофии сердца, без нарушения кровообращения, всегда отмечается значительная гипертрофия коры надпочечников [4]. Это может свидетельствовать, что в ответ на изменение работы сердца, в стадии ком-

пенсаторной перестройки миокарда, одной из приспособительных реакций является гиперактивация надпочечников. Т.е. защитный эффект тиамин может реализоваться не через коферментную функцию, а опосредованно, через активацию эндокринного аппарата. В таком случае может меняться скорость реакций дефосфорилирования производных тиамин, гормонально контролируемых в экстремальных ситуациях, и эти реакции могут стать маркерными. Кроме того, при опосредованном антистрессорном влиянии тиамин дозы его, как лечебного препарата, могут быть повышены для усиления инсулиновой компоненты [3, 4], через которую реализуется это влияние.

Неизученность механизмов превращений тиамин в стрессорных ситуациях, при явном кардиотропном эффекте его этерифицированных препаратов, определили необходимость выяснения концентраций фосфорилированных форм В₁ – тиаминди- и трифосфата (ТТФ), активности самих ферментов биотрансформации физиологических активных форм тиамин.

Материалы и методы

При моделировании стресса применяли два типа воздействий: эмоционально-болевое и сильное болевое. В экспериментах использовали белых беспородных крыс-самцов массой 170-220 г, содержащихся на полноценном рационе вивария. Эмоционально-болевое раздражение (ЭБР) вызывали комплексом воздействий (свет, звонок, электрический ток силой 10 мА, 10 минут) в одно и то же время (утром) в течение трёх суток. За развитием стресс-реакции следили по нарастанию уровня 11-окси-кортикостероидов. Моделирование сильного

болевого раздражения (БР) достигалось наложением мягкой лигатуры, не сдавливающей артерии, на всё более дистальные участки хвоста животных в течение 3-х суток.

Опыты выполнены на 84 крысах, предварительно разделенных на семь групп: контрольная; животных подвергавшихся ЭБР; ЭБР на фоне трёхдневного введения тиамин в дозах 2 мг/кг за 2 часа до раздражения; ЭБР на фоне трёхдневного введения окситиамина в дозах 200 мг/кг за 2 часа до воздействия; животных подвергавшихся БР; БР на фоне введения витамина в вышеуказанных дозах и условиях; аналогично БР на фоне введения антивитамина. Контрольной группе крыс, животным ЭБР и БР в равном объеме вводился 0,95%-й раствор NaCl. Забор образцов материала осуществлялся под тиопенталовым наркозом через 1 час после последнего стресс-воздействия.

Детектацию общего тиамин (Т) проводили флуориметрическим методом [5]. Уровень коферментной формы – суммарного ТДФ – ферментативно [6] с помощью дрожжевой апопируватдекарбоксылазы. Свободную и связанную формы ТДФ определяли после разделения гомогенатов тканей или гемолизатов крови на колонке (1,8x50 см) с сефадексом G-25, уравновешенной 0,02М фосфатным буфером, pH 6,8. Содержание ТТФ (2 мл крови или 0,5 мл гомогената) фиксировали флуориметрически [7] после фракционирования фосфатов на SP-сефадексе G-25. Фосфат неорганический (Φ_n) находили по методу Sargy et al. [8].

Тиамин- (Т-киназа, КФ 2.7.6.2.) и тиаминдифосфаткиназную (ТДФ-киназа, КФ 2.7.4.15) активности оценивали согласно известным методикам [9], используя по 0,1 и 0,5 мл крови или гомогената, соответственно. Активность тиаминдифосфатазы (ТДФ-аза, КФ 3.6.1.6) определяли по приросту Φ_n [8], тиаминтрифосфатазы (ТТФ-аза, КФ 3.6.1.28) – по количеству ТДФ, образовавшегося за время инкубации аликвот в стандартных условиях [6]. Транскетолазную активность регистрировали методом Брунса [10]. Эффект ТДФ – согласно общепринятому тесту [11]. Концентрацию белка – по методу Брэдфорда [12] и поглощению при 280 нм.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли на персональном компьютере с помощью методов вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Исследование метаболизма тиамин, его ди- и трифосфорного эфиров в крови и тканях контрольных и стрессуемых животных не выявило значительных различий со стороны общего пула витамина ($p > 0,05$; табл. 1-4). Данные литературных источников показывают [3,4], что в условиях сбалансированного питания содержание общего тиамин как правило не может служить информативным показателем его обменного процесса, так как отражает суммарную концентрацию всех активных фосфорилированных форм. Недостаточно достоверно (p около 0,05) оказалось и снижение

общего ТДФ – коферментной формы витамина. При дифференцированном определении связанного ТДФ, находящегося в сфере действия ТДФ-зависимых ферментов, и свободного, выполняющего депонирующую функцию [1], к 3 дню опыта в первую очередь прослеживается снижение свободного кофермента, свидетельствуя о весьма успешном протекании в начальной стадии резистентности зависимых от ТДФ ферментативных реакций и вероятном нарушении скорости их в более поздние сроки, с развитием хронического стресса. Это нашло подтверждение в стабильности показателей ТДФ-эффекта ($p > 0,5$), теста широко используемого в клинике на обеспеченность организма тиамин и активности ТДФ-зависимой транскетолазы ($p > 0,5$), ключевого фермента обмена углеводов.

Однако, как следует из таблиц 1-4, наряду со снижением концентрации свободного ТДФ, субстрата ТДФ-киназной реакции, при иммобилизационном стрессе снижается уровень ТТФ, обеспечивающего генерацию и распространение нервного импульса, а также трансмембранный перенос Ca^{2+} [3]. Содержание трифосфорного эфира в сердце и мозге уменьшается наполовину. Одновременно достоверно ($p < 0,001$) повышается активность специфической ТТФ-азы, катализирующей деградацию ТТФ. Обращает внимание и тот факт, что в условиях максимально препятствующих дефосфорилизу ТТФ [9] его концентрация в крови, печени и сердце животных достигает 13-14% от общего содержания V_1 , т.е. можно ожидать, что помимо участия в трансмембранном переносе, нервной проводимости трифосфорный эфир выполняет функцию депо ТДФ, пополняя в условиях дефицита пул кофермента по механизму активного обмена: $TTF \rightarrow TDF + \Phi_n$.

Общую направленность биотрансформации тиамин обычно оценивают исходя из соотношения активностей ферментов синтеза и деградации фосфатов V_1 . Сопоставление активности ТДФ- и ТТФ-синтезирующих систем – Т-киназы и ТДФ-киназы в крови, мозге, печени и сердце (табл. 1- 4) показывает, что изменения скорости образования ТТФ, при действии стрессорных раздражителей, всегда гораздо более значительны, чем изменения скорости синтеза ТДФ. Специфика функционирования киназ в условиях стресса определяется молекулярно-кинетическими параметрами обоих ферментов и её проявление во многом зависит от концентрации витамина, как субстрата, в используемых тканях. Как следует из данных таблиц 1-4, концентрация общего тиамин в мозге, печени и сердце крыс в норме составляет 3,30; 9,79 и 6,21 мкг/г, соответственно, а его содержание через 3 суток после стрессорного воздействия снижается, в зависимости от исследуемой ткани, на 0,61-2,56 мкг. Величины констант полунасыщения (K_m) Т-киназы тиамин, при естественных различиях их числовых значений, равны для этих тканей 0,12; 6,00 и 0,45 мкМ, а аналогичные характеристики для ТДФ-киназы – на порядок выше и находятся в пределах 39-80 мкМ [9]. Содержание ТДФ, субстрата ТДФ

Таблица 1. Содержание тиамин, его эфиров, Φ_n (мкг/г ткани), активность ферментов биотрансформации активных форм витамина (нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹), транскетолазы (мкмоль седогептулозо-7-фосфата г Нв) и ТДФ-эффект в мозге крыс при эмоционально-болевым и сильным болевом раздражении (M±m):

Показатели	Контроль	ЭБР	ЭБР на фоне введения		БР	БР на фоне введения	
			Т	ОТ		Т	ОТ
Общий Т	3,30±	2,87±0,2	4,06±0,2*	2,32±0,1*	2,69±0,1	3,81±0,3*	2,30±0,2*
Общий ТДФ	2,08±0,9	1,76±0,08	1,98±0,06	1,33±*0,03	1,75±0,01	1,87±0,06	1,26±0,0*
Белковосвязанный ТДФ	1,12±0,03	1,09±0,04	1,09±0,02	0,80±0,02	0,98±0,05	1,04±0,03	0,79±0,04*
Свободный ТДФ	0,97±0,02	0,67±0,03*	0,93±0,02	0,51±0,02*	0,54±0,05*	0,80±0,04	0,43±0,02*
ТТФ	0,65±0,04	0,38±0,03*	0,51±0,04	0,43±0,02	0,30±0,06*	0,46±0,02	0,52±0,03
Φ_n	12,07±0,42	14,3±0,3	17,1±2,69	7,06±1,17*	14,4±0,3	20,01±1,71*	6,11±0,76*
Т-киназа	0,29±0,01	0,35±0,01*	0,32±0,02	0,26±0,02	0,36±0,01*	0,31±0,02	0,25±0,02
ТДФ-киназа	4,2±0,06	3,3±0,05*	3,9±0,07	3,5±0,03	3,0±0,04	3,7±0,06	3,4±0,02
ТДФ-аза	4,2±0,2	3,9±0,4	4,2±0,3	3,9±0,2	4,0±0,5	4,8±0,4	3,7±0,3
ТТФ-аза	9,76±0,9	12,9±0,8*	11,0±0,7	9,18±0,4	13,7±0,8*	11,1±0,5	9,01±0,4
Транскетолаза	642,23±4,07	630,07±2,49	645,02±3,16	597,18±2,80	609,04±5,06	634,14±4,91	561,03±3,85
ТДФ-эффект	658,40±5,82	631,23±4,19	647,38±6,03	601,39±4,78	628,02±3,18	640,08±6,15	577,24±5,84

Примечание: В таблицах 1-4 активность Т-киназы и ТДФ-киназы выражали в нмоль · ч⁻¹ · мг⁻¹ и пмоль · ч⁻¹ · мг⁻¹, соответственно. * – коэффициент достоверности различий показателей группы опытных животных по отношению к показателям группы контрольных, p<0,001.

Таблица 2. Содержание тиамин, его эфиров, Φ_n (мкг/г ткани), активность ферментов биотрансформации активных форм витамина (нмоль · мин⁻¹ · мг⁻¹), транскетолазы (мкмоль седогептулозо-7-фосфата · г Нв) и ТДФ-эффект в сердце крыс при эмоционально-болевым и сильным болевом раздражении (M±m):

Показатели	Контроль	ЭБР	ЭБР на фоне введения		БР	БР на фоне введения	
			Т	ОТ		Т	ОТ
Общий Т	6,21±0,2	6,67±0,3	7,03±0,2*	3,53±0,4*	5,42±0,3	6,84±0,3	3,31±0,5*
Общий ТДФ	4,41±0,3	3,70±0,2	4,92±0,3	2,74±0,4*	3,53±0,3	4,56±0,2	2,48±0,3*
Белковосвязанный ТДФ	2,56±0,05	2,42±0,04	2,60±0,05	1,87±0,04*	2,3±0,06	2,49±0,03	1,72±0,05*
Свободный ТДФ	1,84±0,06	1,23±0,05*	2,51±0,06*	0,91±0,04*	1,19±0,04*	2,28±0,05	0,79±0,07
ТТФ	1,05±0,06	0,52±0,07*	0,97±0,05	0,86±0,04	0,49±0,07*	0,92±0,04	0,78±0,05*
Φ_n	44,7±1,2	63,94±4,6*	67,18±3,7*	34,9±2,8	66,32±5,1*	70,24±3,9*	36,7±4,8
Т-киназа	0,35±0,03	0,41±0,02*	0,38±0,01	0,29±0,02*	0,42±0,03*	0,39±0,02	0,27±0,03*
ТДФ-киназа	6,8±0,08	4,5±0,1*	5,4±0,06	4,7±0,07*	3,9±0,09*	5,1±0,1	4,2±0,1*
ТДФ-аза	16,0±0,5	18,3±1,2	20,2±0,9	16,9±0,7	16,7±1,1	21,14±1,0	15,1±0,6
ТТФ-аза	7,55±0,4	13,37±0,3*	9,17±0,4	5,12±0,3*	14,60±0,5*	9,26±0,4	4,90±0,30*
Транскетолаза	181,2±0,43	179,3±0,78	213,02±0,85	102,3±1,40*	164,1±1,09	179,4±0,85	97,3±1,21*
ТДФ-эффект	197,82±0,76	180,9±0,64	219,70±1,0	105,6±1,2*	175,0±0,56	196,47±0,83	103,4±0,94*

– киназы, составляет 60-80% от содержания общего тиамин [1]. Такое соотношение величин K_m и концентраций тиамин и ТДФ прежде всего означает, что в силу высокого сродства к специфическому субстрату сохраняющийся в течение всего срока опыта остаточный уровень тиамин является гарантией устойчивого функционирования Т-киназы, тогда как уже незначительные отклонения содержания образующегося из тиамин ТДФ будут вести к сравнительно большим изменениям скорости ТДФ-киназной реакции, что служит одним из механизмов регуляции ферментативных процессов и, соответственно, уровня ТДФ.

В отличие от тиамин второй субстрат тиамин-киназных реакций – АТФ, очевидно, не сможет оказывать столь заметного влияния на скорость синтеза коферментной формы – ТДФ или наиболее фосфорилированной – ТТФ. При общем содержании макроэрга в печени крыс 1,6 – 1,9 мг/г, его снижение при стрессорных состояниях не превышает 0,24-0,30 мг [2], т.е. реальные колебания АТФ не затрагивают значений K_m для субстратов, которые в случае Т- и ТДФ-киназы близки между собой и равны 0,8 и 0,5 мМ, соответственно [9].

Можно полагать, что регуляция метаболических процессов, сопровождающихся накоплением или утилизацией АТФ, будет зависеть не от абсо-

лютной концентрации того или иного макроэрга, а от их соотношения – величины энергетического заряда, характеризующего степень заполнения системы АТФ–АДФ–АМФ высокоэнергетическими фосфатными связями [13]. Однако и в этой ситуации наблюдающееся незначительное уменьшение энергетического потенциала при стрессе [3] все еще позволяет оставаться адениловой системе в пределах устойчивого стационарного состояния (0,6-0,8) характерного, например, для метаболизма АТФ в печени. Прослеживаемые закономерности функционирования анаболических ферментов биотрансформации тиамин во многом объясняют симптоматику возникновения и развития некоторых метаболических нарушений, вызываемых изменениями уровня V_1 [9, 14], указывая, что наиболее лабильной, подверженной быстрому снижению формой тиамин является трифосфорный эфир. Концентрация ТДФ, в особенности его белковосвязанная форма, сравнительно устойчива и изменяется в процессе биосинтеза ТДФ-зависимых белков после утилизации свободного кофермента и расщепляющегося до ТДФ трифосфорного эфира.

Активность ТТФ-азы при иммобилизационном стрессе (табл. 1-4) существенно возрастает (p<0,001) во всех анализируемых тканях. Второй

Таблица 3. Содержание тиамин, его эфиров, Φ_n (мкг/г ткани), активность ферментов биотрансформации активных форм витамина (нмоль \cdot мин⁻¹ \cdot мг⁻¹), транскетолазы (мкмоль седогептулозо-7-фосфата \cdot г Нв) и ТДФ-эффект в печени крыс при эмоционально-болевым и сильном болевом раздражении (M \pm m):

Показатели	Контроль	ЭБР	ЭБР на фоне введения		БР	БР на фоне введения	
			Т	ОТ		Т	ОТ
Общий Т	9,79 \pm 0,3	7,68 \pm 0,5	12,04 \pm 0,6*	5,42 \pm 0,3*	7,23 \pm 0,4	10,11 \pm 0,5	5,04 \pm 0,4*
Общий ТДФ	6,38 \pm 0,4	5,01 \pm 0,4	6,00 \pm 0,3	3,86 \pm 0,3*	4,65 \pm 0,5	5,49 \pm 0,4	3,60 \pm 0,3*
Белковосвязанный ТДФ	3,36 \pm 0,2	2,80 \pm 0,3	3,07 \pm 0,2	2,46 \pm 0,3*	2,68 \pm 0,2	2,91 \pm 0,1	2,31 \pm 0,2*
Свободный ТДФ	3,03 \pm 0,1	2,14 \pm 0,1*	3,19 \pm 0,2	1,42 \pm 0,2*	2,00 \pm 0,1*	2,74 \pm 0,2	1,26 \pm 0,2*
ТТФ	1,45 \pm 0,1	0,97 \pm 0,1*	1,33 \pm 0,15	1,07 \pm 0,1	0,83 \pm 0,07*	1,28 \pm 0,1	1,04 \pm 0,2
Φ_n	24,6 \pm 0,8	37,2 \pm 1,2*	40,0 \pm 1,7*	20,4 \pm 1,0	40,6 \pm 1,4*	40,7 \pm 1,2*	22,8 \pm 1,0
Т-киназа	0,49 \pm 0,03	0,60 \pm 0,04*	0,53 \pm 0,03	0,49 \pm 0,04	0,62 \pm 0,03*	0,53 \pm 0,03	0,50 \pm 0,02
ТДФ-киназа	10,4 \pm 0,4	9,2 \pm 0,4*	10,00 \pm 0,3	9,5 \pm 0,3	8,6 \pm 0,5*	9,6 \pm 0,4	9,4 \pm 0,3
ТДФ-аза	8,11 \pm 0,4	12,03 \pm 0,6*	14,42 \pm 0,9*	9,32 \pm 0,8	13,17 \pm 0,6*	14,01 \pm 0,8*	10,1 \pm 0,6
ТТФ-аза	3,78 \pm 0,09	5,94 \pm 0,21*	4,23 \pm 0,20	3,01 \pm 0,18	6,03 \pm 0,27*	4,67 \pm 0,30	2,76 \pm 0,21*
Транскетолаза	949,6 \pm 5,2	768,2 \pm 7,9	914,9 \pm 5,0	618,2 \pm 6,1*	729,1 \pm 8,2	883,6 \pm 6,4	597,8 \pm 8,0*
ТДФ-эффект	1002,1 \pm 6,7	801,7 \pm 5,4	940,7 \pm 8,2	623,7 \pm 7,3*	785,0 \pm 7,6	902,4 \pm 6,3	604,1 \pm 6,9*

Таблица 4. Содержание тиамин, его эфиров, Φ_n (мкг/г ткани), активность ферментов биотрансформации активных форм витамина (нмоль \cdot мин⁻¹ \cdot мг⁻¹), транскетолазы (мкмоль седогептулозо-7-фосфата \cdot г Нв) и ТДФ-эффект в крови крыс при эмоционально-болевым и сильном болевом раздражении (M \pm m):

Показатели	Контроль	ЭБР	ЭБР на фоне введения		БР	БР на фоне введения	
			Т	ОТ		Т	ОТ
Общий Т	0,559 \pm 0,022	0,503 \pm 0,034	0,907 \pm 0,078*	0,418 \pm 0,029	0,480 \pm 0,021	0,778 \pm 0,027*	0,401 \pm 0,023*
Общий ТДФ	0,304 \pm 0,015	0,269 \pm 0,020	0,298 \pm 0,012	0,162 \pm 0,010*	0,243 \pm 0,034	0,289 \pm 0,012	0,150 \pm 0,017*
Белковосвязанный ТДФ	0,084 \pm 0,010	0,071 \pm 0,010	0,073 \pm 0,007	0,051 \pm 0,010*	0,067 \pm 0,010	0,069 \pm 0,012	0,046 \pm 0,008*
Свободный ТДФ	0,216 \pm 0,01	0,197 \pm 0,005	0,232 \pm 0,01	0,137 \pm 0,008*	0,176 \pm 0,021*	0,207 \pm 0,009	0,129 \pm 0,01*
ТТФ	0,079 \pm 0,007	0,040 \pm 0,005*	0,057 \pm 0,006	0,048 \pm 0,005*	0,036 \pm 0,01*	0,053 \pm 0,005	0,045 \pm 0,004*
Φ_n	36,07 \pm 0,60	37,80 \pm 0,42	49,02 \pm 0,54*	31,06 \pm 0,50	39,42 \pm 0,36	53,21 \pm 0,62*	28,97 \pm 0,51
Т-киназа	4,85 \pm 0,61	5,67 \pm 0,42*	5,05 \pm 0,31	3,94 \pm 0,30*	6,23 \pm 0,17*	5,57 \pm 0,42	3,46 \pm 0,40*
ТДФ-киназа	0,276 \pm 0,012	0,228 \pm 0,007*	0,259 \pm 0,01	0,191 \pm 0,015*	0,189 \pm 0,115*	0,240 \pm 0,012	0,177 \pm 0,014*
ТДФ-аза	6,861 \pm 0,304	5,032 \pm 0,247	6,040 \pm 0,214	5,870 \pm 0,412	6,430 \pm 0,401	7,028 \pm 0,320	6,130 \pm 0,224
ТТФ-аза	2,050 \pm 0,174	2,956 \pm 0,161*	2,317 \pm 0,108	1,710 \pm 0,153	3,272 \pm 0,203*	2,410 \pm 0,186	1,614 \pm 0,097*
Транскетолаза	107,2 \pm 0,3	109,3 \pm 0,4	128,1 \pm 0,4	78,2 \pm 0,3*	116,21 \pm 0,3	118,10 \pm 0,6	75,7 \pm 0,8*
ТДФ-эффект	109,7 \pm 0,1	111,3 \pm 0,2	130,2 \pm 0,3	81,4 \pm 0,2*	121,0 \pm 0,2	121,1 \pm 0,1	77,3 \pm 0,4*

гидролитический фермент – ТДФ-аза, интенсифицирующий расщепление коферментной формы – ТДФ, при активации в сердце и печени стабилен в мозге и крови. Разнонаправленность скорости катализа для ТДФ-азы отмечена нами ранее у больных с неврологическими проявлениями остеохондроза и в модельном эксперименте аллергического энцефаломиелита [9, 15].

Описанные выше закономерности функционирования киназ и гидролаз отражают работу типичного футильного (энергосзатратного) цикла [16], где взаимодействующие друг с другом ферменты угнетаются собственными продуктами (рис. 1):

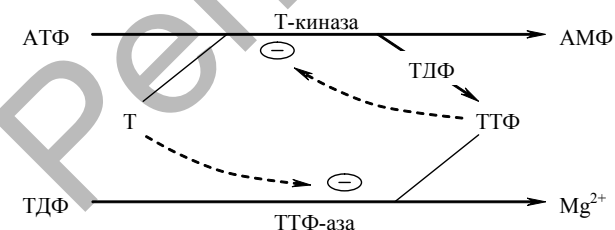


Рис.1. Схема функционирования ферментов обмена тиамин.

Данный принцип отчетливо прослеживается в опытах, когда стрессирование животных осуществлялось на фоне предварительного введения тиамин. В этих условиях накапливающийся в крови и тканях витамин (табл. 1-4), как субстрат фермен-

та начального этапа фосфолирования – Т-киназы, ингибирует активность ТТФ-азы, фермента дефосфорилиза наиболее энергоёмкой фосфорилированной формы – ТТФ, а ТТФ, в свою очередь, блокирует по смешанному типу [9] скорость Т-киназной реакции. В итоге повышенная при инъекциях тиамин активность Т-киназы в условиях иммобилизационного стресса способствует частичному восстановлению уровня свободного ТДФ, а сниженная витамином скорость гидролиза ТТФ - заметной нормализации последнего.

Футильные циклы находятся под сложным регуляторным контролем [16]. Обе тиаминные киназы субъединичные ферменты, представленные ассоциирующе-диссоциирующими системами олигомеров, равновесие между которыми устанавливается медленно, за время, сравнимое со скоростью каталитического акта [9]. ТТФ-аза – однопочечный белок, подверженный быстрым конформационным превращениям под действием ТТФ и (или) аллостерических эффекторов (ионов Mg^{2+}) и его активность более чем на порядок превышает активность киназ. Высокая скорость конформационных переходов в присутствии ТДФ характерна и для ТДФ-азы [17]. Прослеживающиеся взаимосвязи структуры и функций биомолекул указывают, что в стрессорных ситуациях основным регуляторным фактором уровня фосфатов тиамин будет оборачиваемость ферментов гидролиза, находя-

щихся, очевидно, под гормональным контролем [2, 9].

Тиамин – антистрессорный агент [3, 4]. Его антистрессорное действие на начальной стадии адаптации вряд ли может реализоваться по коферментному механизму, через активацию транскетолазы, пируват- и альфа-кетоглутаратдегидрогеназных комплексов. Содержание белковосвязанного ТДФ через 3 суток после инъекций витамина (табл. 1-4) существенно не меняется. Устойчивыми остаются и показатели транскетолазной активности и ТДФ-эффекта. И только в условиях хронического стресса, когда вслед за снижением уровня ТДФ достоверно понижается концентрация свободного ТДФ, ведущая к нарушению биосинтеза ТДФ-зависимых ферментов *de novo*, возможно проявление коферментного механизма. Полученные нами результаты перекликаются с опубликованными данными [4] об опосредовании антистрессорных эффектов тиамин путем активации гормонообразовательной функции инсулоцитов. Если исходить из того, что в-клетки инсулоцитов испытывают хронический дефицит SH-групп, расходуемых на биосинтез инсулина [18], а витамин В₁ *in vivo*, благодаря антиоксидантным свойствам, повышает тканевую уровень восстановленных тиолов [1], то именно в поджелудочной железе эти свойства могут наиболее полно реализоваться через SH-зависимое увеличение гормоносинтеза.

Опосредованный через инсулин механизм действия тиамин вытекает и из анализа балансовых реакций образования и гидролиза ТДФ. В условиях *in vivo* гормон не влияет на процессы фосфорилирования тиамин. Скорость увеличения тканевого содержания кофермента после витаминной нагрузки была одинаковой у интактных и получавших инсулин крыс [4]. Скорость же последующей убыли ТДФ, связанной с его расщеплением, отчетливо зависела от гормонального фона, снижаясь у инсулин-получавших животных. Такое влияние инсулин хорошо коррелирует с поведением Т-киназы и ТДФ-азы в условиях стресса. Кортикостероиды оказывают противоположное действие на ферменты обмена тиамин, так как они взаимосвязаны с инсулиновой компонентой [2]. Таким образом, увеличивая общий инсулиновый фон, исходно введенный тиамин будет вести к адаптации организма к экзогенным раздражителям.

В свою очередь, показатели регистрируемые при предварительном введении окситиамина как антивитамина, не всегда укладываются в обычную цепочку метаболических превращений (табл. 1-4). Непонятно, например, однонаправленное действие витамина и антивитамина на ТДФ-киназную и ТДФ-азную реакции при стрессе, а также снижение окситиамином скорости транскетолазной реакции в мозге, куда он не проникает. Очевидно правомочно предположение [4], что введение гидроксильной группы в пиримидиновый компонент молекулы В₁ превращает это соединение в биологически активный оксопиримидин – 5-тиазолметил,

в значительной мере наделенный способностью угнетать синтез нуклеиновых кислот, блокировать *in vitro* дыхание, а *in vivo* вызывать диабет. Стрессированные на фоне инъекций окситиамина крысы находились в состоянии глубокого ступора. При вскрытии у 7 из 12 животных обнаружены признаки атрофии вилочковой железы, тогда как среди особей получавших тиамин, таких изменений не оказалось.

Результаты дискриминантного анализа подтвердили информативность избранных нами показателей.

Выводы:

– при эмоционально-болевым и сильным болевым раздражении, в начальной стадии резистентности, биохимические изменения обмена тиамин сопровождаются активацией специфической ТДФ-азы и снижением концентрации ТДФ, существенно не отражаясь на уровне коферментной формы – ТДФ;

– инъекции физиологических доз витамина перед стресс-воздействием способствуют адаптации организма к изменившимся условиям. Вероятной причиной антистрессорного эффекта тиамин является его участие в окислительно-восстановительных процессах, направленных на поддержание уровня восстановленных тиолов в клетке и усиление инсулинсинтеза;

Литература

1. Островский Ю.М. Витамин В₁ (тиамин) // Витамины / Под ред. М.И. Смирнова. - : Медицина, 1974. - С.173-213.
2. Виноградов В.В. Гормональные механизмы метаболического действия тиамин. - Мн.: Наука и техника, 1984. - 197с.
3. Аткинсон Р. Биодобавки доктора Аткинса. - М., 2000. - 474с.
4. Виноградов В.В. Стресс и витамины. - Гродно, 2000. - 260с.
5. Leveille G.A., Modified thiochrome procedure for the determination of urinary thiamin // Amer. G. Clin. Nutr. - 1972. - Vol. 25. - P. 273-274.
6. Ullrich J. Assay of thiamine pyrophosphate // Methods in Enzymology. - 1970. - Vol.18A. - P. 109-115.
7. Пархоменко Ю.М., Рыбина А.А., Польщак Р.Б. Разделение фосфорных эфиров тиамин на катионообменном сефадексе / Укр. биохим. журн. - 1976. - Т.48. - С.384-387.
8. Sapry M.K., Geetha H., Shetty T.K. A single reagent method of phosphate estimation in phosphatase(s) assay / Ind. J. Biochem. Biophys. - 1987. - Vol. 24. - P. 340-343.
9. Черникевич И.П. Ферментные системы биотрансформации активных форм витамин В₁ (структура, свойства, регуляция): Дис. ... докт. хим. наук. - Гродно, 1996. - 313с.
10. Bruns F.H., Dunwold H., Noltmann E. Quantitative Bestimmung von Sedoheptulose-7-phosphat und einige Eigen Schäften der Transketolase der Erythrocytes und des Blutserum // Biochemische Zeitschrift. - 1958. - Vol. 330. - P. 497-508.
11. Dreyfus K.H., Lundquist C.G. Clinical application of blood transketolase determination // New Engl. J. Med. - 1962. - Vol. 267. - P. 596-601.
12. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding // Anal. Biochem. - 1976. - Vol. 72. - P. 248-254.
13. Atkinson P.E. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter: Interaction with feedback modifiers // Biochemistry. - 1968. - Vol.7. - P. 4030-4034.
14. Haas H. Thiamin and the brain // Ann. Rev. Nutr.- 1988. - Vol. 8. - P. 483-515.
15. Гриценко Э.А., Черникевич И.П., Гордеев Я.Я. и др. Метаболизм витамин В₁ и его ди- и трифосфорного эфиров при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите // Укр. биохим. журн. - 1993. - Т.65. - С.84-94.
16. Сальков Е.Е. Регуляция энергетического обмена и физиологическое состояние организма. - М.: Наука, 1978. - С.15-32.
17. Yamasaki M. Activation of thiamine pyrophosphate phosphohydrolase of rat liver by ATP // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1964. - Vol. 16. - P. 416-421.
18. Hsu B., Siiteri P., Kuhn R. Binding proteins of steroid hormones / Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.- 1986.- Vol. 149.- P.577-591.