

МЕХАНИЗМ РЕАЛИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ ВИТАМИНА В1 В КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ РАКОМ ЖЕЛУДКА, В УСЛОВИЯХ ХИРУРГИЧЕСКОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА



¹Н. Н. Костеневич, ¹И. П. Черникевич, ²В. В. Баум, ¹В. А. Малашенко

¹Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

²1134 Военный клинический медицинский центр Вооруженных Сил
Республики Беларусь, Гродно, Беларусь

Введение. Вероятность хирургического вмешательства всегда предопределяет стрессорное состояние индивидуума, поэтому целесообразен поиск путей оптимизации и (или) коррекции неблагоприятного воздействия.

Цель исследования – выяснение механизма антистрессорной активности витамина В1 в условиях операционного вмешательства.

Материал и методы. Интенсивность метаболического процесса исследовалась на лизатах крови доноров (n=19) и пациентов, страдающих раком желудка (n=64) третьей стадии, оперированных в плановом порядке в возрасте 51-70 лет, взятой из локтевой вены за трое суток до операции, после премедикации, в наиболее травматичный момент операции, после экстубации, а также в первые и третьи сутки послеоперационного периода. Хирургическое вмешательство проводилось под комбинированной многокомпонентной анестезией с использованием закиси азота, оксидбутирата натрия и эпидуральной блокады. Содержание В1 и его производных в крови находили методом ион-парной обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Результаты. В крови доноров и пациентов, страдающих раком желудка, наблюдается повышенное содержание тиаминмонофосфата и свободного тиамина. Скорость гидролитической тиаминмонофосфатазной реакции при этом не высока. На этапах премедикации и максимальной травматичности концентрация монофосфорного эфира быстро снижается при активации монофосфатазы. Очевидно, что гидролиз тиаминмонофосфата является скоростью-лимитирующим звеном обменного процесса витамина В1. Уровень свободного тиамина на всех этапах остается устойчиво повышенным.

Тиаминмонофосфатазная активность проявляется при двух рН-оптимумах – 6,0 и 9,0. Гидролиз тиаминмонофосфата при рН 9,0 катализируется щелочной фосфатазой. В области рН 6,0, помимо тиаминмонофосфорного эфира, фермент гидролизует только п-нитрофенилфосфат, флавиномонуклеотид и фосфотирозин, что позволяет отнести его к кислой фосфатазе печеночного типа. Отмеченные изменения в обмене В1 в условиях стресса касаются главным образом некоферментных форм – тиаминмоно-, трифосфата и свободного тиамина, расходуемых на этапах восстановления тиолов как компонентов инсулиносинтеза.

Выводы. Использование витамина В1 позволяет оптимизировать развитие стрессорной реакции на всех этапах хирургического лечения. Его защитное действие реализуется посредством активации инсулин-синтетической функции поджелудочной железы, повышающей уровень иммунореактивного инсулина в крови. Формирование наиболее благоприятных физиологических условий для инсулиносинтеза обеспечивает повышенный «фон» свободного тиамина, создающийся за счет гидролиза некоферментных форм витамина. Прослежена связь метаболизма тиамина с обменом В2 и регуляцией внутриклеточных сигнальных путей.

Ключевые слова: тиамин, эфиры тиамина, ферменты обмена витамина В1, лизаты крови, операционное вмешательство.

VITAMIN B1 BIOLOGICAL FUNCTION IMPLEMENTATION IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH STOMACH CANCER UNDER SURGICAL INTERVENTION

¹N. N. Kostenevich, ¹I. P. Chernikevich, ²V. V. Baum, ¹V. A. Malashenko

¹Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

²1134 Military Clinical Medical Center, Grodno, Belarus

Background. The probability of undergoing surgery always predetermines the state of stress in a person; therefore, it is advisable to search for ways to optimize and (or) reduce this unfavourable effect.

Objective. To find out the mechanism of vitamin B1 antistress activity during surgery.

Material and methods. Metabolism intensity was investigated on donors' blood lysates (n = 19) and those of patients with stage III stomach cancer (n = 64), referred to an elective surgery, aged 51-70. The blood was taken from the cubital vein three days before the operation, after premedication, during the most traumatic moment of the operation, after extubation, as well as on the first and third days of the postoperative period. The surgery was performed under combined multicomponent anesthesia using nitric oxide, sodium hydroxybutyrate, and epidural block.

Thiamine and thiamine diphosphate kinase activities were assessed by the concentration of the formed thiamine di- and triphosphates of the vitamin. The activities of thiamine mono-, di- and triphosphatases were determined by the release of inorganic phosphate. The concentration of inorganic phosphate was recorded colorimetrically. The content of B1 and its derivatives in the blood was determined by the method of ion-pair reversed-phase HPLC.

Results. There has been observed an increased content of thiamine monophosphate and that of free thiamine in the blood of donors and patients with stomach cancer. The registered rate of the hydrolytic thiamine monophosphatase reaction is not high. At the stages of premedication and maximum trauma of surgical exposure, the concentration of monophosphoric ester rapidly decreases alongside with monophosphatase activation. Therefore, the thiamine monophosphate hydrolysis is the rate-limiting link of vitamin B1 metabolism. The level of free thiamine remains persistently increased at all stages of surgical treatment.

Thiamine monophosphatase activity is manifested at two pH optima – of 6.0 and 9.0. Thiamine monophosphate hydrolysis at pH of 9.0 is catalyzed by alkaline phosphatase. At pH of 6.0, in addition to thiamine monophosphoric ester, the enzyme hydrolyzes only p-nitrophenyl phosphate, flavin mononucleotide and phosphotyrosine, that allows it to be classified as hepatic acid phosphatase.

The noted changes in B1 metabolism under stress concern mainly non-coenzyme forms - thiamine mono-, triphosphate, and free thiamine, which are used at the stages of thiol reduction as important components of insulin synthesis.

Conclusions. The use of vitamin B1 allows to optimize the development of the stress response at all stages of surgical treatment. Its protective effect is achieved through the activation of the insulin-synthetic function of the pancreas, which increases the level of immunoreactive insulin in the blood. The formation of the most favorable physiological conditions for insulin synthesis provides an increased background of free thiamine, which is created due to the hydrolysis of non-coenzyme forms of the vitamin. The relationship between thiamine metabolism and B2 exchange and regulation of intracellular signaling pathways has been traced.

Keywords: *thiamine, thiamine phosphoric esters, enzymes of active forms of vitamin B1, blood lysates, surgical intervention.*

Автор, ответственный за переписку:

Костеневич Николай Николаевич, Гродненский государственный медицинский университет;
e-mail: chemistry@grsmu.by

Corresponding author:

Kostenevich Nicolai, Grodno State Medical University;
e-mail: chemistry@grsmu.by

Для цитирования: Механизм реализации биологической функции витамина В1 в крови больных раком желудка в условиях хирургического вмешательства / Н. Н. Костеневич, И. П. Черникевич, В. В. Баум, В. А. Малащенко // Гепатология и гастроэнтерология. 2021. Т. 5, № 2. С. 184-190. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2021-5-2-184-190>

For citation: Kostenevich NN, Chernikevich IP, Baum VV, Malashenko VA. The mechanism of realization of the biological function of vitamin B1 in the blood of patients with stomach cancer under surgical intervention. *Hepatology and Gastroenterology*. 2021;5(2):184-190. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2021-5-2-184-190>

Введение

Известно, что подготовка к хирургическому вмешательству, сама операционная травма, а также послеоперационный период предъявляют повышенные требования к гомеостатическим системам организма, вызывая у пациентов мобилизацию защитных ресурсов, активацию деятельности разных отделов нервной системы и эндокринного аппарата [1]. Причем реакция щитовидной железы и надпочечников на всех этапах – существенный фактор «хирургической биологии». Благодаря успехам современной анестезиологии, сейчас можно в значительной степени оградить пациента от болевых ощущений, связанных с операционной травмой. Однако возможность развития «адаптационного синдрома» в предоперационном и послеоперационном периодах анальгезирующие средства не устраняют. Кроме того, применение этих средств не исключает полностью вероятность неконтролируемого стресса и во время операции, так как многие из них обладают способностью к неспецифической активации эндокринных желез. В результате реакция организма на наркоз и хирургическое вмешательство иногда

становится чрезмерной и теряет свой компенсаторный характер, что может привести к тяжелым патофизиологическим сдвигам [2]. В этих условиях существует реальная опасность вероятного перераздражения секреторных элементов, функциональное истощение которых чревато непредсказуемыми осложнениями как во время операции, так и после нее.

Поскольку возникающая при стресс-синдроме адекватная ответная реакция абсолютно необходима организму как инструмент адаптации к действию сильнейших раздражителей на этапах оперативного лечения, в современной хирургии остаются актуальными вопросы, связанные с ее оптимизацией. В этой связи заслуживают внимания факты, свидетельствующие о гомеостатической функции витамина В1 при стрессе. В экспериментах на крысах установлено, что тиамин не только ослабляет эффекторную связь гипофиза со щитовидной железой, корой адреналовых желез, но и, что особенно важно, предотвращает их функциональное истощение даже в условиях мощного и длительного болевого стресса [3]. Исходя из предположения, что эти данные могут быть полезными в практике хирургическо-

го лечения пациентов, мы попытались проследить за биопревращениями тиамин по всему ходу подготовки и проведения операционного вмешательства.

Цель исследования – выяснение механизма реализации биологической функции витамина В1 в условиях стресса.

Материал и методы

Интенсивность метаболического процесса исследовалась на лизатах крови доноров (n=19) и пациентов, страдающих раком желудка (n=64) третьей стадии, оперированных в плановом порядке, в возрасте 51-70 лет, взятой из локтевой вены за трое суток до операции, перед анестезией, после премедикации, в наиболее травматичный момент операции, после экстубации, а также в первые и третьи сутки послеоперационного периода. Хирургическое вмешательство проводилось под комбинированной многокомпонентной анестезией с использованием закиси азота, оксibuтирата натрия и эпидуральной блокады.

Премедикацию осуществляли за 30-40 минут до поступления в операционную внутримышечным введением атропина в дозе 0,01 мг/кг (но не более 1 мг) и промедола в дозе 0,2-0,3 мг/кг, соответствующей возрасту и массе пациента. Интубацию трахеи проводили после внутривенной инъекции листенона (100 мг). Искусственную вентиляцию лёгких выполняли в режиме умеренной гипервентиляции на фоне тотальной миорелаксации D-тубокурарином или ардуаном. Глубина наркоза у всех пациентов, по классификации Гуедея, соответствовала уровню III1-III2, которую определяли по клиническим признакам.

Послеоперационное обезболивание осуществлялось введением в эпидуральное пространство 7,0-10,0 мл 2% раствора тримекаина каждые 3 часа с помощью аппарата для длительной эпидуральной анестезии в течение трех суток.

За общий тиамин (Т) принималась сумма свободного витамина и продуктов его биопревращения: тиаминмоно- (ТМФ), ди- (ТДФ) и три- (ТТФ) фосфатов. Содержание В1 и фосфорилированных производных находили методом ион-парной обращённо-фазовой ВЭЖХ. Перед инъекцией в хроматограф пробы окисляли с помощью 4,3 мМ феррицианида калия в 16% КОН. Разделение осуществляли на хроматографе Agilent 1100 при скорости потока 0,5 мл/мин на аналитической колонке PRP-1 (Ø 4,1×150 мм, поли(стирол-дивинилбензол), размер частиц 5 мкм; Hamilton Co) с протекторным колоночным картриджем (Ø 2,3×25 мм). Мобильная фаза состояла из 50 мМ К-фосфатного буфера pH 8,5, содержащего 25 мМ тетра-н-бутиламмоний-гидроген-сульфат и 4% тетрагидрофуран. Тиохром и его производные детектировали по флуоресценции при длине волны возбуждения 365 нм, эмиссии –

433 нм [4]. Уровень коферментной формы – суммарного ТДФ – ферментативно [5] с помощью дрожжевой апопируватдекарбоксилазы. Свободную и связанную формы ТДФ определяли после разделения гемолизатов крови на колонке (Ø 1,8×50 см) с сефадексом G-25, уравновешенной 0,02 М К-фосфатным буфером pH 6,8.

Тиамин- (Т-киназа) и тиаминдифосфат- (ТДФ-киназа) киназные активности оценивали согласно известным методикам, используя по 0,1 и 0,5 мл лизата, соответственно. Активность тиаминмоно- (ТМФ-аза), ди- (ТДФ-аза) и три (ТТФ-аза) фосфатаз – по высвобождению неорганического фосфата (РН) [5, 6]. Концентрацию РН измеряли колориметрически [7]. Проявляющиеся при дефосфорилизе ТМФ активности кислой и щелочной гидролаз, помимо РН, параллельно оценивали по накоплению п-нитрофенола, фиксируя оптическую плотность при 405 нм.

Скорость транскетолазной реакции регистрировали методом Брунса [8]. Эффект ТДФ – согласно общепринятому тесту [5]. Концентрацию белка – по методу Брэдфорда.

Экспериментальные данные обрабатывали статистически с вычислением средних арифметических (М), среднеквадратических отклонений (SD) и квадратических ошибок репрезентативности средних арифметических (SEM). Для оценки достоверности разности средних величин применяли t-критерий Стьюдента. Все расчеты проводились с использованием программы GraphPad Prism 5.0.

Результаты и обсуждение

В живых организмах витамин В1 присутствует в виде пяти витаминер – нефосфорилированного тиамин, ТМФ, ТДФ, ТТФ и аденозин-тиамин-трифосфата (АТТФ), из которых биохимическая роль установлена только для ТДФ, выполняющего каталитические функции в составе почти 40 белков-ферментов. Значение остальных производных для жизнедеятельности клетки неизвестно [3, 9]. Постулат об участии ТТФ в проведении нервных импульсов, работе Na⁺-, Ca²⁺- или Cl⁻ каналов не находит убедительных доказательств [9]. Сегодня более правдоподобна концепция регуляторной роли трифосфорного эфира в поддержании процессов анаэробного производства энергии (гликолиза) [10].

Из пяти выявленных витаминер в крови человека обнаруживаются первые четыре. Причем в сравнительном аспекте с гомогенатами мозга, сердца или печени в исследованных нами лизатах доноров и пациентов, страдающих раком желудка, просматривается повышенное содержание ТМФ и свободного тиамин, соответственно, – 9,3 и 12,5% от общего количества витамина в крови (табл. 1) [11]. Регистрируемая скорость гидролитической ТМФ-азной реакции

при этом невысока и на порядок уступает скоростям дефосфорилирования тиаминди- и трифосфатов. Характерно, что из производных тиамина ТМФ единственная фосфорилированная форма, которая образуется исключительно при дефосфорилизе ТДФ: никаких специализированных путей или ферментов биосинтеза монофосфата в клетках животных и человека не обнаружено [7]. Во время операции, по мере нарастания стрессорной составляющей (на этапах максимальной травматичности операционного воздействия и экстубации), концентрация монофосфорного эфира быстро снижается при параллельной активации монофосфатазы. Наблюдающаяся корреляционная зависимость между активностью белковой макромолекулы и уровнем эфира, а также низкая ТМФ-азная активность, по отношению к активностям ТДФ- и ТТФ-фосфогидролаз,

позволяет полагать, что гидролиз ТМФ является скоростью-лимитирующим звеном обменного процесса витамина В1. В итоге уровень свободного тиамина на всех этапах лечения остается устойчиво повышенным, стабильно обеспечивая субстратом – тиаминот Т-киназную реакцию в синтезе кофермента В1 – ТДФ. Подтверждение тому – постоянство содержания в первые сутки хирургического вмешательства белковосвязанного ТДФ. Устойчивыми в течение нескольких суток остаются и показатели ТДФ-эффекта. И только в условиях длительного стресса на третьи сутки, вслед за снижением концентрации свободного дифосфорного эфира, начинает просматриваться нарушение скорости синтеза ТДФ-зависимой транскетолазы, оборачиваемость которой находится в пределах 24-36 часов.

Таблица 1. – Содержание тиамина, его фосфорных эфиров, неорганического фосфата (Р_н) (мкг•мг⁻¹), активность ферментов метаболизма витамина (нмоль•мин⁻¹•мг⁻¹), транскетолазы (мкмоль седогептулозо-7-фосфата•г Нв) и ТДФ-эффект в крови доноров и пациентов, страдающих раком желудка, в условиях хирургического вмешательства (М±SD)

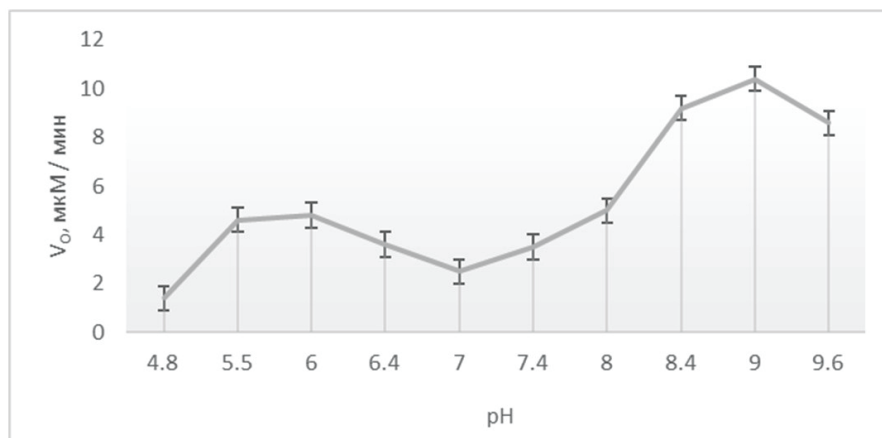
Table 1. – The content of thiamine, its phosphorus esters, inorganic phosphate (P_n) (mcg•mg⁻¹), the activity of enzymes of vitamin metabolism (nmol•min⁻¹•mg⁻¹), transketolase (mcmol sedoheptulose-7-phosphate•g Hb) and TDF-effect in the blood of donors and patients with gastric cancer under conditions of surgery (M±SD)

Показатель	Доноры	Онкобольные					
		обследованные группы					
		за 3 дня до операции	перед анестезией	во время вмешательства	после экстубации	через 1 день	через 3 дня
Общий тиамин (Т)	0,56±0,02	0,59±0,02	0,57±0,015	0,54±0,02	0,54±0,01	0,52±0,01	0,49±0,03
Свободный тиамин	0,07±0,01	0,08±0,005	0,1±0,007	0,13±0,01	0,12±0,006	0,10±0,005	0,07±0,01
ТМФ	0,052±0,01	0,050±0,01	0,029±0,04	0,015±0,005*	0,017±0,003*	0,023±0,004	0,37±0,02
Общий ТДФ	0,43±0,02	0,45±0,03	0,44±0,02	0,42±0,04	0,43±0,015	0,40±0,02	0,36±0,03
Свободный ТДФ	0,14±0,01	0,16±0,015	0,12±0,01	0,08±0,01*	0,10±0,01*	0,12±0,015	0,13±0,01
Связанный ТДФ	0,29±0,02	0,31±0,02	0,30±0,015	0,32±0,02	0,29±0,015	0,27±0,01	0,24±0,02
ТТФ	0,01±0,003	0,009±0,003	0,012±0,0015	0,013±0,004	0,011±0,001	0,008±0,001	0,007±0,001
Р _н	36,07±0,60	37,80±0,42	40,52±0,36	45,39±0,52	44,01±0,70	41,93±0,67	39,06±1,2
Т-киназа	4,85±0,62	4,91±0,48	5,60±0,34	5,63±0,40	5,50±0,31	5,07±0,49	6,01±0,37
ТДФ-киназа	0,28±0,02	0,27±0,03	0,35±0,02	0,39±0,04*	0,34±0,03	0,31±0,015	0,30±0,02
ТМФ-аза, рН 6,0	0,30±0,02	0,34±0,02	0,43±0,015	0,58±0,03*	0,52±0,02*	0,42±0,03	0,39±0,03
ТМФ-аза, рН 9,0	0,42±0,05	0,47±0,04	0,64±0,03	0,82±0,01*	0,77±0,04*	0,59±0,02	0,53±0,025
ТДФ-аза	3,86±0,31	3,90±0,36	3,91±0,43	4,01±0,26	4,07±0,30	3,87±0,24	3,87±0,23
ТТФ-аза	3,25±0,17	3,24±0,2	2,92±0,12	2,89±0,15	3,00±0,2	3,28±0,15	3,32±0,17
Транскетолаза	107,2±0,3	110,3±0,4	108,7±0,8	111,7±1,0	109,3±0,5	104,2±0,6	98,1±1,4
ТДФ-эффект	109,1±0,4	112,2±0,3	107,9±1,2	110,2±0,8	108,6±0,9	101,4±1,0	93,2±0,9

Примечание: активность Т-киназы и ТДФ-киназы выражали в нмоль•ч⁻¹•мг⁻¹ и в пмоль•ч⁻¹•мг⁻¹, соответственно.

ТДФ – эффект – в тех же единицах, что и активность транскетолазы; * – p<0,001 относительно группы пациентов до операции

Notes: the activity of T-kinase and TDP-kinase was expressed in nmol•h⁻¹•mg⁻¹ and in pmol•h⁻¹•mg⁻¹, respectively. TDF – effect – in the same units as the activity of transketolase; * – p < 0,001 relative to the group of patients before surgery



Примечание: применены следующие буферные растворы – 20 мМ ацетатный (pH 4,86); 25 мМ трис-малеатный (pH 5,5-8,5); 50 мМ трис-HCl (pH 9,0); 50 мМ глициновый (pH 9,5)
 Note: the following buffer solutions were used - 20 mM acetate (pH 4.86); 25 mM tris-maleate (pH 5.5-8.5); 50 mM tris-HCl (pH 9.0); 50 mM glycine (pH 9.5)

Рисунок 1. – Влияние pH на скорость гидролиза ТМФ в лизатах крови доноров и пациентов, страдающих раком желудка

Figure 1. – The effect of pH on the rate of TMP hydrolysis in blood lysates from donors and patients with gastric cancer

ТМФ-азная активность проявляется при двух выраженных pH-оптимумах – в слабокислой (pH 6,0) и щелочной (pH 9,0) средах (рис. 1). Оба фермента являются Mg^{2+} -независимыми белками, однако активность щелочной фосфатазы возрастает в 1,4 раза под влиянием 5 мМ концентрации катионов Mg^{2+} . Согласно кинетическим исследованиям гидролиз ТМФ при pH 9,0 описывается уравнением Михаэлиса-Ментен, при этом величины кажущихся K_m и V_{max} , рассчитанные по уравнению линейной регрессии в координатах Хейнса, составляют, соответственно, $67 \pm 0,9$ мкМ и $1,2 \pm 0,1$ мкМ/мин. Белок ингибировался левамизолом (декарис) по бесконкурентному типу, осуществлял гидролиз широкого круга субстратов с фосфомоноэфирными связями, преимущественно ассоциировался на наружной стороне форменных элементов крови, что позволяет отнести его к мембранно-ассоциированной щелочной фосфатазе.

Кислая ТМФ-аза (pH 6,0) сосредоточена больше в плазме крови, металл-независима, в исследованном диапазоне концентраций ТМФ от 0,02 до 0,5 мМ подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен со значением кажущейся K_m , равной $76 \pm 1,1$ мкМ. Левамизол не оказывал ингибирующего действия на активность кислой фосфатазы. Помимо монофосфорного эфира тиамин, фермент способен осуществлять гидролиз только п-нитрофенилфосфата, флавиномононуклеотида и фосфотирозина (табл. 2), что позволяет классифицировать его как кислую фосфатазу печёночного типа (LMW – AP) [12].

Таким образом, ТМФ служит физиологическим субстратом фермента, биохимические функции которого состоят в дефосфорилировании флавиномононуклеотида и нескольких белков, участвующих в процессах роста, дифферен-

цировки и адгезии клеток [7, 13]. Это указывает на связь системы метаболизма тиамин с обменом витамина B2 и регуляцией внутриклеточных сигнальных путей. Специфического белка, расщепляющего только тиаминмоноэфирную связь, в крови человека не обнаружено.

Реакции гидролиза ТТФ и ТДФ находятся под строгим генетическим контролем и активация ТТФ-азы, в особенности ТДФ-азы, проявляется в поздние сроки стрессорного или иного воздействия, когда концентрация свободного кофермента – ТДФ, необходимого для

формирования холоформ ТДФ-зависимых белковых структур, не станет критической (табл. 1). Еще более «консервативна» синтетическая Т-киназная реакция, обеспечивающая превращение свободного витамина в коферментную форму. Но если гидролиз ТТФ до ТДФ под действием ТТФ-зы быстр и эффективен, то процесс синтеза в Т-киназной реакции медленный, но стабильный. Результаты данного исследования и обмена тиамин в условиях голодания показыва-

Таблица 2. – Субстратная специфичность ТМФ-азы лизатов крови

Table 2. – Substrate specificity of TMP-ase of blood lysates

Субстрат	Высвобожденный Рн, нмоль	% активности
п-Нитрофенилфосфат	$2,6 \pm 0,2$	100
Флавиномононуклеотид	$1,9 \pm 0,3$	73
Фосфотирозин	$0,8 \pm 0,1$	31
ТМФ	$0,5 \pm 0,2$	19
Пиридоксаль-5-фосфат	$< 0,05$	< 1
β -Глицерофосфат	$< 0,05$	< 1
Глюкозо-6-фосфат	$< 0,05$	< 1
Фруктозо-1,6-дифосфат	$< 0,05$	< 1
Инозинмонофосфат	$< 0,05$	< 1
АМФ	$< 0,05$	< 1

Примечание: реакцию проводили в течение 20 минут (в случае п-нитрофенилфосфата, флавиномононуклеотида, фосфотирозина и ТМФ) или 60 минут (с остальными соединениями) при 37°C в смеси, содержащей 25 мМ трис-малеат pH 5,5, 1 мМ субстрат, 20 мкг бычьего сывороточного альбумина и 0,2 мл лизата в общем объеме 1 мл. М±м для трех независимых экспериментов

Note: the reaction was carried out for 20 min (in the case of p-nitrophenyl phosphate, flavinmononucleotide, phosphotyrosine and TMP) or 60 min (with the rest of the compounds) at 37°C in a mixture containing 25 mM of tris-maleate pH 5.5, 1 mM of substrate, 20 mM of bovine serum albumin and 0.2 ml of lysate in a total volume of 1 ml. M±m for three independent experiments

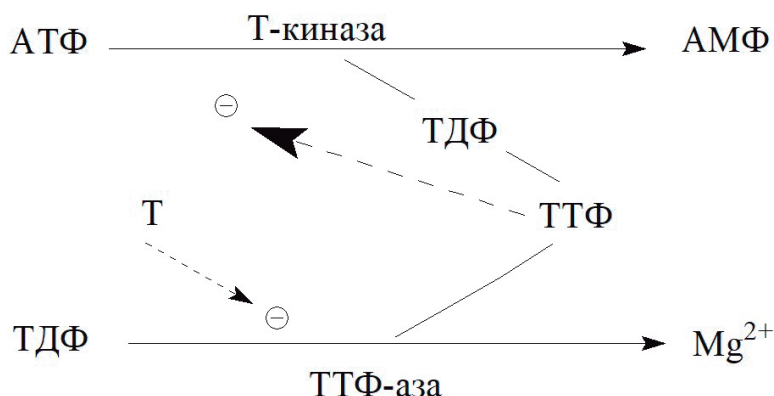


Рисунок 2. – Схема функционирования ферментов обмена тиамин
Figure 2. – The scheme of functioning of thiamine enzyme metabolism

ют, что в начальные и наиболее травматичные моменты стрессорного воздействия защитное антистрессорное действие витамина В1 проявляется через некоферментные фосфорилированные формы – ТМФ, ТТФ и свободный тиамин [11]. Коферментные функции ТДФ прослеживаются в более поздние сроки, на этапах реабилитации организма.

Описанные выше закономерности функционирования киназ и фосфатаз, содержание фосфатов отражают работу типичного футильного (энергосзатратного) цикла, где взаимодействующие в сопряженных кинетических реакциях ферменты угнетаются начальными и конечными продуктами собственного биопревращения (рис. 2).

Можно полагать (табл. 1), что, хотя каталитические фосфатазные реакции (ТДФ-аза и ТТФ-аза) не являются скорость-лимитирующими, в критические моменты стрессорного воздействия они будут играть доминирующую роль в зависимых от витамина В1 обменных механизмах в силу высокой оборачиваемости, на порядок превышающей оборачиваемость киназ, и гормональной регуляции гидролитических процессов. Такой вывод вытекает из того факта, что на этапах хирургического лечения возникающий при дефосфорилизации фосфатов повышенный «фон» свободного тиамин будет создавать благоприятные физиологические условия для протекания инсулиносинтеза [3]. Нами показано, что между концентрацией свободного витамина и уровнем иммунореактивного инсулина, защищающего надпочечники от функционального перераздражения при стрессе, отчетливая корреляционная зависимость. Если исходить из

того, что β-клетки инсулоцитов испытывают хронический дефицит SH-групп, расходуемых на биосинтез инсулина, а витамин В1 *in vivo*, благодаря антиоксидантным свойствам, повышает тканевый уровень восстановленных тиолов, то именно в поджелудочной железе эти свойства могут наиболее полно реализовываться через SH-зависимое увеличение гормоносинтеза [14].

Опосредованный через инсулин механизм действия тиамин вытекает и из анализа балансовых реакций образования и гидролиза тиаминди- и трифосфатов. 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 [1]. Интенсивность же последующей убыли ТДФ и ТТФ, связанной с гидролизом, отчетливо зависела от гормонального «фона», изменяясь у животных, получавших инсулин. Такое влияние инсулина хорошо коррелирует с поведением тиаминных киназ и фосфатаз в условиях стресса. Кортикостероиды оказывают противоположное действие на ферменты обмена тиамин, так как они взаимосвязаны с инсулиновой компонентой [1, 3]. Таким образом, увеличивая общий инсулиновый «фон», повышенный уровень тиамин будет вести к адаптации организма к экзогенным раздражителям.

Выводы

Использование витамина В1 позволяет оптимизировать развитие стрессорной реакции на всех этапах хирургического лечения. Его защитное действие реализуется посредством активации инсулин-синтетической функции поджелудочной железы, повышающей уровень иммунореактивного инсулина в крови. Формирование наиболее благоприятных физиологических условий для инсулиносинтеза обеспечивает повышенный «фон» свободного тиамин, создающийся за счет гидролиза некоферментных форм витамина. Прослежена связь метаболизма тиамин с обменом В2 и регуляцией внутриклеточных сигнальных путей.

References

1. Vinogradov VV. Stress i vitaminy. Grodno; 2000. 260 p. (Russian).
2. Vinogradov VV, Vinogradov SV, Tumanov AV. Korrektsiya stressornoj patologii shhitovidnoj zhelezy i serdca. Grodno; 2020. 173 p. (Russian).
3. Vinogradov VV. Nekofermentnaja vitaminologiya. Grodno; 2000. 535 p. (Russian).
4. Kolos IK, Makarchikov AF. Metabolizm tiaminmonofosfata v pecheni kuricy [Metabolism of thiamine diphosphate in chicken liver]. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo universiteta* [Vestnik of Vitebsk State University]. 2019;2(103):45-52. (Russian).

5. Orishaka OV, Vovchuk IL, Petrov SA. Vydelenie i issledovanie biohimicheskikh svoystv tiaminpirofosfokinazy nemalignizirovannogo i opuholevogo miometrija zhenshhin [Extracting and study of biochemical properties of thiamine pyrophosphokinase from non-malignant and tumor tissue of myometrium]. *Biomedicinskaja himija* [Biomedical chemistry]. 2014;60(5):602-617. (Russian).
6. Chernikevich IP, Khilmanovich EN, Kravec EV. Vydelenie i radiometricheskij metod opredeleniya aktivnosti ATP: tiamindifosfatfosfotransferazy iz mitohondrij golovnogo mozga svinji [Selection and radiometric method of determining the activity of ATP: thiaminediphosphatephosphotransferase from mitochondria of the pig's brain tissue]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of the Grodno State Medical University]. 2017;15(4):442-446. doi: 10.25298/2221-8785-2017-15-4-442-446. (Russian).
7. Kolas IK, Makarchikov AF. Copurification chicken liver soluble thiamine monophosphatase and low molecular weight acid phosphatase. *Ukrainskij biohimicheskij zhurnal* [Ukrainian Biochemical Journal]. 2017;89(6):13-21. doi: 10.15407/ubj89.06.013.
8. Tomasheva EV. Geterogenost aktivnykh centrov transketolazy [Heterogeneity of active centers of transketolase]. *Vestnik Grodnenskogo gosudarstvennogo universiteta imeni Janki Kupaly. Seriya 5. Jekonomika. Sociologija. Biologija* [Vestnik of Yanka Kupala state university of Grodno. Series 5. Economics. Sociology. Biology]. 2014;3(182):135-140. (Russian).
9. Makarchikov AF. Vitamin B₁: metabolism i funktsii. *Biomedicinskaja himija* [Biomedical chemistry]. 2009;55(3):278-297. (Russian).
10. Makarchikov AF. Tiamintrifosfat: novyj vzgljad na nekofermentnuju funktsiju vitamina B₁. Minsk: Belorusskaja nauka; 2008. 430 p.
11. Chernikevich IP, Kostenevich NN, Baum VV, Kulichevskaja IN, Rinejskij AI. K voprosu metabolizma vitamina B₁ pri golodanii [To the question of metabolism of vitamin B₁ during starvation]. In: Naumau IA, editor. *Sovremennye problemy gigieny, radiacionnoj i jekologicheskoy mediciny*. Vol. 10. Grodno: GrSMU; 2020. p. 206-220. (Russian).
12. Raugei G, Ramponi G, Chiarugi P. Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart. *Cell. Mol. Life Sci.* 2002;59(6):941-949. doi: 10.1007/s00018-002-8481-z.
13. Kolos IK, Makarchikov AF. Identifikacija jenzimov gidroliza tiaminmonofosfata v pecheni kur. *Ukrainskij biohimicheskij zhurnal* [Ukrainian Biochemical Journal]. 2014;86(6):39-49. (Russian).
14. Hsu B, Siiteri P, Kuhn R. Binding proteins of steroid hormones. *Pro. Soc. Exptl. Biol. Med.* 1986;149:577-591.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

Сведения об авторах:

Костеневич Николай Николаевич, Гродненский государственный медицинский университет, e-mail: chemistry@grsmu.by, ORCID: 0000-0002-2565-863X

Черникевич Иван Петрович, д-р мед. наук, проф., Гродненский государственный медицинский университет, e-mail: chemistry@grsmu.by, ORCID: 0000-0001-5319-5014

Баум Владимир Владимирович, Военный клинический медицинский центр Вооруженных Сил Республики Беларусь, e-mail: chemistry@grsmu.by

Малашенко Вероника Александровна, Гродненский государственный медицинский университет, e-mail: chemistry@grsmu.by

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Financing. The study was performed without external funding.

Conformity with principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee.

Information about the authors

Kostenevich Nicolai, Grodno State Medical University, e-mail: chemistry@grsmu.by, ORCID: 0000-0002-2565-863X

Chernikevich Ivan, PhD, MD (Medicine), Professor; Grodno State Medical University, e-mail: chemistry@grsmu.by, ORCID: 0000-0001-5319-5014

Baum Vladimir, 1134 Military Clinical Medical Center, e-mail: chemistry@grsmu.by

Malashenko Veronika, Grodno State Medical University, e-mail: chemistry@grsmu.by

Поступила: 19.09.2021

Принята к печати: 15.10.2021

Received: 19.09.2021

Accepted: 15.10.2021