

ДИАБЕТ И ДЕФИЦИТ ВИТАМИНА В₁: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Кудырко Т. Г.^{1,2}, Лучко Т. А.¹, Русина И. М.^{1,2},
Макар Е. А.¹, Макарчиков А. Ф.^{1,2}

¹РНИУП «Институт биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси»,

²УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно

Актуальность. Сахарный диабет является самым распространенным метаболическим заболеванием, частота встречаемости которого неуклонно растет. По данным Всемирной организации здравоохранения, число болеющих диабетом в мире в период с 1980 по 2014 г. увеличилось со 108 до 422 млн, что составило 8,5% населения старше 18 лет [1]. Прогнозы на ближайшее будущее неутешительны – заболеваемость находится на восходящей траектории, так что к 2045 г. количество пациентов, страдающих диабетом, может превзойти 620 млн [2]. Очевидно, что столь стремительный рост заболеваемости может объясняться только экологическими причинами и изменениями стиля жизни. Хотя полный список факторов, провоцирующих развитие диабета, еще не установлен, к числу основных причин относятся неправильное питание, действие химических загрязнителей среды, малая физическая активность, инфекции и хронический стресс [3]. В ряде работ показано, что у пациентов, страдающих диабетом 1 и 2 типа, может снижаться активность эритроцитарной транскетолазы либо содержание витамина В₁ в крови. Несмотря на то, что результаты таких исследований неоднозначны, в научной литературе распространено мнение о наличии дефицита тиамин при диабете [4]. Вместе с тем каких-либо данных, касающихся метаболизма витамина В₁ во внутренних органах пациентов с диабетом – показателя, реально отражающего тиаминный статус организма, – нет. В силу этого представления о тиаминном дефиците при диабете недостаточно обоснованы.

Цель настоящей работы состояла в исследовании содержания витамина В₁ в печени крыс с экспериментальным диабетом.

Материал и методы исследования. Диабет моделировали на крысах-самцах линии Вистар, содержащихся на обычном рационе вивария, путем однократного внутрибрюшинного введения стрептозотоцина в дозе 60 мг/кг или аллоксана в дозе 170 мг/кг. В каждом из экспериментов контрольная и опытная группы включали по 5 особей. Через 1 месяц (в стрептозотоциновой модели) или 1,5 месяца (в аллоксановой модели) животных декапитировали, печень извлекали, замораживали в жидком азоте и хранили при -85°C до использования.

Содержание производных тиамина определяли методом обращенно-фазовой ион-парной ВЭЖХ. Образцы печени гомогенизировали в 5-ти объемах охлажденной до $+4^{\circ}\text{C}$ 12% трихлоруксусной кислоты в гомогенизаторе со стеклянным пестиком 10 циклами и центрифугировали 5 мин при 15000 g. Для удаления кислоты супернатант обрабатывали трехкратным объемом диэтилового эфира, повторяя экстракцию 3 раза. Перед инъекцией в хроматограф пробу обрабатывали 4,3 мМ феррицианида калия в 15% КОН для окисления тиаминфосфатов в соответствующие производные тиохрома. Разделение проводили на хроматографе Agilent 1200 при скорости потока 0,5 мл/мин, используя аналитическую колонку PRP-1 (\varnothing 4,1×150 мм, поли-(стиролдивинил-бензол), размер частиц 5 мкм; Hamilton Co) с протекторным колоночным картриджем. Мобильная фаза состояла из 50 мМ К-фос-фатного буфера, рН 8,5, содержащего 25 мМ тетра-*n*-бутилам-монийгидрогенсульфат и 4% тетрагидрофуран. Производные тиохрома детектировали по флуоресценции при длине волны возбуждения 365 нм и эмиссии – 433 нм.

Экстракты для колоночной хроматографии готовили, гомогенизируя ткань в 5-ти объемах охлажденного до 4°C 0,1 М К-фосфатного буфера (рН 7,0), содержащего 50 мМ КСl и 1 мМ ЭДТА, в стеклянном гомогенизаторе с последующим центрифугированием (1000 об/мин, 10 минут). Для разделения свободного и связанного с белками ТДФ образцы объемом 2 мл хроматографировали на колонке (1×20 см) с сефадексом G-25, уравновешенной 50 мМ К-фосфатным буфером, рН 7,0, содержащим 50 мМ КСl, при 4°C со скоростью потока 0,3 мл/мин, собирая фракции по 1,2 мл. Концентрацию ТДФ в элюате определяли ферментативным методом после кипячения фракций (2 мин) и отделения

осадков центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин.). Аликвоты (0,1 мл) надосадочной жидкости инкубировали 30 минут при 25°C для рекомбинации ТДФ с апопируватдекарбоксилазой из пивных дрожжей. Активность образовавшегося холофермента регистрировали в сопряженной с алкогольдегидрогеназой реакции по убыли поглощения НАДН при 340 нм. Количество ТДФ рассчитывали по калибровочному графику, построенному с использованием хроматографически чистого стандарта.

Концентрацию глюкозы в крови измеряли с помощью тест-полосок Bionime. Концентрацию белка в постколочных фракциях определяли методом Bradford.

Статистические расчеты выполнялись с использованием программы GraphPadPrism 5.0. Достоверность разности оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. В большинстве клеток млекопитающих витамин В₁ представлен тиаминем и его несколькими производными – тиаминмонофосфатом (ТМФ), тиаминдифосфатом (ТДФ), тиаминтрифосфатом (ТТФ) и аденозин-тиаминтрифосфатом (АТТФ). В настоящее время биологическая роль ТМФ, ТТФ и АТТФ неизвестна. Особо важным для оценки В₁-обеспеченности является содержание ТДФ – коферментной формы, на долю которой может приходиться до 90% общего тиаминового пула клетки. ТДФ выполняет коферментные функции, будучи прочно связанным с ТДФ-зависимыми ферментами, т. е. находясь в протеидизированной форме. Кроме того, свободный ТДФ служит субстратом для образования ТМФ, ТТФ и АТТФ. Таким образом, ТДФ занимает центральное место в системе метаболизма тиамин; его содержанием и протеидизацией определяется ход важнейших реакций энергетического, углеводного и аминокислотного обмена.

В модели аллоксанового диабета концентрации разных форм витамина В₁ в печени животных контрольной группы составляли (M±SD, нмоль/г ткани) 0,71±0,12, 2,20±0,29, 27,90±4,24, 0,034±0,008 и 0,032±0,009, соответственно, тиамин, ТМФ, ТДФ, ТТФ и АТТФ. Развитие диабета приводило к статистически значимому увеличению содержания тиамин (на 94%), ТМФ (на 49%), ТДФ (на 25%) и ТТФ (на 138%). Концентрация АТТФ

у диабетных крыс также возрастала на 34%, однако эти изменения оказались статистически не достоверными. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при аллоксановом диабете в печени повышается уровень как нефосфорилированного тиамин, так и всех его производных.

Содержание протеидизированного и свободного ТДФ в печени крыс при диабете исследовалось в стрептозотоциновой модели. В процессе хроматографии экстракта печени ТДФ элюируется двумя пиками, первый из которых выходит в свободном объеме колонки, совпадая с белковым профилем, тогда как второй, соответствующий свободной форме кофермента, значительно запаздывает. Фракции каждого из пиков объединяли, измеряли полученные объемы, замораживали и хранили при -20°C для последующего анализа ТДФ. Результаты определения ТДФ в объединенных фракциях каждого из пиков показали, что общее содержание кофермента (сумма свободной и белковосвязанной форм) у животных опытной группы на 45% выше по сравнению с контролем ($46,1 \pm 6,9$ нмоль/г ткани против $31,7 \pm 2,2$ нмоль/г ткани). В то же время в печени диабетных крыс значительно снижался уровень протеидизированного ТДФ – на 47% (с $9,1 \pm 1,8$ нмоль/г ткани до $4,8 \pm 1,4$ нмоль/г ткани) на фоне повышения концентрации свободной формы кофермента (с $22,5 \pm 1,6$ нмоль/г ткани до $41,3 \pm 8,1$ нмоль/г ткани). Это, очевидно, указывает на наличие функциональной недостаточности витамина B_1 при диабете, поскольку, как уже отмечалось выше, ТДФ реализует свои коферментные функции, находясь в белковосвязанной форме. С другой стороны, рост концентрации свободного ТДФ в печени диабетных животных носит, по-видимому, адаптационный характер. Известно, например, что транскетолаза печени крысы активируется инсулином [5]. Поэтому вероятное снижение транскетолазной активности при инсулиновой недостаточности может хотя бы частично компенсироваться под действием высоких концентрации ТДФ, который способен влиять на скорость биосинтеза апофермента [6]. Не исключено также, что повышение уровня свободного ТДФ, как и других форм витамина B_1 , в печени крыс при диабете обусловлено активацией пока еще неизвестных некоферментных механизмов действия тиамин.

Выводы. Полученные нами данные свидетельствуют об отсутствии дефицита витамина В₁ в печени крыс при диабете. Более того, содержание производных тиамин в ткани печени диабетных животных возрастает. Исходя из результатов настоящей работы, снижение уровня тиамин в крови пациентов с сахарным диабетом, наблюдавшееся в ряде исследований [4], может объясняться более высокой скоростью транспорта витамина в клетки внутренних органов, что имеет адаптационное значение. Поскольку содержание белковосвязанного ТДФ в печени диабетных крыс значительно уменьшается, можно говорить о том, что при диабете имеет место функциональная тиаминовая недостаточность.

Литература

1. Diabetes [Electronic resource] / Mode of access: <http://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> – Date of access: 03.05.2018.
2. IDF diabetes atlas, 8th edition. – International Diabetes Federation, 2017. – 147 p.
3. Pácal, L. Evidence for altered thiamine metabolism in diabetes: Is there a potential to oppose gluco- and lipotoxicity by rational supplementation? / L. Pácal, K. Kuricová, K. Kaňková // World J. Diabetes. – 2014. – Vol. 5. – P. 288-295.
4. Каразе, А. М. Влияние инсулина на активность транскетолазы и трансальдолазы в печени крыс / А. М. Каразе, А. И. Колотилова // Биохимия. – 1973. – Т. 38. – С. 515-519.
5. Виноградов, В. В. Гормональные механизмы метаболического действия тиамин / В. В. Виноградов – Мн: Наука и техника, 1984. – 197 с.