

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЕ
УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ «ИНСТИТУТ БИОХИМИИ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НАЦИОНАЛЬНОЙ
АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОХИМИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

(г. Гродно, 17-18 мая 2018 г.)

Сборник научных статей

(статьи в сборнике опубликованы в авторской редакции)

Под общей редакцией

*доктора медицинских наук, профессора И.Н.Семенени
доктора биологических наук, профессора, члена-корреспондента
НАН Беларуси А.Г.Мойсеёнка*

*Минск
2018*

Asthma Immunol. – 2008. – Vol. 81, №3. – P. 247-55.

6. Savolainen J., Lintu P., Kosonen J., and oths. Pityrosporum and Candida specific and non-specific humoral, cellular and cytokine responses in atopic dermatitis patients // Clin. Exp. Allergy. – 2011. – Vol. 31, №1. – P. 125–134.

7. Akiyama K. The role of fungal allergy in bronchial asthma// Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. – 2013. – Vol. 41, № 3. – P. 149–55.

8. Hiruma M., Maeng D.J., Kobayashi M., and oths. Fungi and atopic dermatitis // Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. – 2014. – Vol. 40, №2. – P.79–83.

9. Adachi A., Horikawa T., Ichihashi M., and oths. Role of Candida allergen in atopic dermatitis and efficacy of oral therapy with various antifungal agents // Arerugi. – 2009. – Vol. 48, №7. – P.19–25.

УДК 577.164.11

ВЛИЯНИЕ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ НА МЕТАБОЛИЗМ ВИТАМИНА В₁ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС

**Т.Г.Кудырко^{1,2}, И.М.Русина^{1,2}, Т.А.Лучко¹, И.К.Колос^{1,2}, В.А.Гуринович¹,
А.Ф.Макарчиков^{1,2}**

¹*Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси», Гродно, Беларусь*

²*Учреждение образования «Гродненский государственный аграрный университет», Гродно, Беларусь*

Резюме. Показано, что при острой гипобарической гипоксии, вызванной имитацией подъема на высоту 11000 м, содержание тиаминтрифосфата в головном мозге крыс возрастает на 35 %, Существенных изменений концентрации тиамина, тиаминмонофосфата и тиаминдифосфата в мозге крыс, подвергнутых гипоксии, не обнаружено.

EFFECT OF HYPOBARIC HYPOXIA ON VITAMIN B₁ METABOLISM IN RAT BRAIN

**T.G.Kudyrko^{1,2}, I.M.Rusina^{1,2}, T.A.Luchko¹, I.K.Kolos^{1,2}, V.A.Gurinovich¹,
A.F.Makarchikov^{1,2}**

¹*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds, NAS of Belarus, Grodno, Belarus*

²*Grodno State Agrarian University, Grodno, Belarus*

Summary. It has been shown that under acute hypobaric hypoxia caused by imitation of elevating to an altitude of 11000 m the content of thiamine triphosphate in rat brain rises by 35 %. No significant changes in thiamine, thiamine

monophosphate and thiamine diphosphate levels were observed in the brain of the rats subjected to hypoxia

Введение. Гипоксия представляет собой патологический процесс, сопровождающий или определяющий развитие многих заболеваний, суть которого в наиболее общем виде можно охарактеризовать, как несоответствие энергетических запросов клетки производству энергии в системе окислительного фосфорилирования. Метаболические нарушения, наблюдаемые в организме при гипоксии, являются прямым следствием недостаточной продукции АТФ. Витамин В₁ в форме тиаминдифосфата (ТДФ) играет ключевую роль в энергетическом обмене клетки, выполняя коферментные функции в составе митохондриальных дегидрогеназных комплексов α -кетокислот [5]. Получены также данные, которые указывают на связь метаболизма тиаминтрифосфата (ТТФ) и глюкозы [1]. Исходя из этого, есть основания полагать, что производные тиамина могут участвовать в краткосрочной адаптации при гипоксии. Влияние острой гипобарической гипоксии на метаболизм витамина В₁ в моделях на животных ранее не изучалось, в связи с чем в настоящее время четкие представления о молекулярных механизмах адаптации, в которых могли бы быть задействованы производные тиамина, отсутствуют.

Цель настоящей работы состояла в исследовании метаболизма витамина В₁ в головном мозге крыс при острой гипобарической гипоксии.

Материалы и методы исследования. В работе использованы ТМФ «Fluka», тетрагидрофуран «Fisher Scientific», тетра-*n*-бутиламмонийгидрогенсульфат (ТБА) «AppliChem Panreac», ТХУ «Sigma», ЛДГ, НАД⁺ «Reanal»; остальные реагенты производства «Реахим» квалификаций «хч» и «осч».

Эксперимент проводился на 14 крысах-самцах (по 7 в контрольной и опытной группах) линии Вистар массой 240–260 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. При работе соблюдались правила, установленные Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета, по защите животных, используемых для научных целей. Гипоксию вызывали путем имитации подъема животных на высоту 11000 м со средней скоростью 23 м/с в вакуум-камере по следующей схеме: подъем (7 мин) – задержка на высоте (3 мин) – спуск (2 мин). После декапитации крыс извлеченный мозг немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при –80 °С.

Концентрацию лактата в сыворотке крови определяли ферментативным методом с помощью ЛДГ из свиной мышцы. Инкубационная смесь включала 0,085 М глицин–0,128 М гидразиновый буфер, рН 9,0, 0,5 мМ НАД⁺, 0,02 мл фермента и 0,02 мл обработанной хлорной кислотой сыворотки крови в общем объеме 1 мл. Реакцию проводили при 37 °С до прекращения роста оптической плотности при 340 нм (время инкубации – 60 мин). Концентрацию лактата рассчитывали по калибровочному графику, построенному с известными количествами молочнокислого кальция.

Содержание глюкозы в сыворотке крови измерялось глюкозооксидазным методом с использованием набора реагентов АО «ДИАКОН-ДС».

Для определения производных тиамин, образцы мозга гомогенизировали в 5-ти объемах охлажденной до +4 °С 12 % ТХУ в гомогенизаторе со стеклянным пестиком 10 циклами и центрифугировали 5 мин при 15000 g. Экстракцию ТХУ осуществляли, трижды обрабатывая супернатант трехкратным объемом насыщенного водой эфира. Перед инъекцией в хроматограф тиаминфосфаты окисляли в соответствующие производные тioxрома с помощью 4,3 мМ феррицианида калия в 15 % КОН. Разделение осуществляли на хроматографе Agilent 1100/1200 при скорости потока 0,5 мл/мин на колонке PRP-1 ($\varnothing$ 4,1 × 150 мм, 5 мкм; Hamilton Co) с протекторным колоночным картриджем ($\varnothing$ 2,3 × 25 мм). Мобильная фаза состояла из 50 мМ К-фосфатного буфера, pH 8,5, содержащего 25 мМ ТБА и 4 %-ный тетрагидрофуран. Производные тioxрома детектировали по флуоресценции (λ_{ex} = 365 нм, λ_{em} = 433 нм) [4].

Достоверность разности оценивали по t-критерию Стьюдента, используя программу GraphPadPrism 5.0. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$).

Результаты исследования и их обсуждение. Быстрый «подъем» крыс на высоту 11000 м в вакуум-камере вызывал острую лактацидемию. По сравнению с контрольной группой концентрация молочной кислоты в крови животных, подвергнутых гипоксии, увеличилась более чем в 3,5 раза (рисунок 1А). В сыворотке крови крыс опытной группы существенно возрастала концентрация глюкозы (рисунок 1Б).

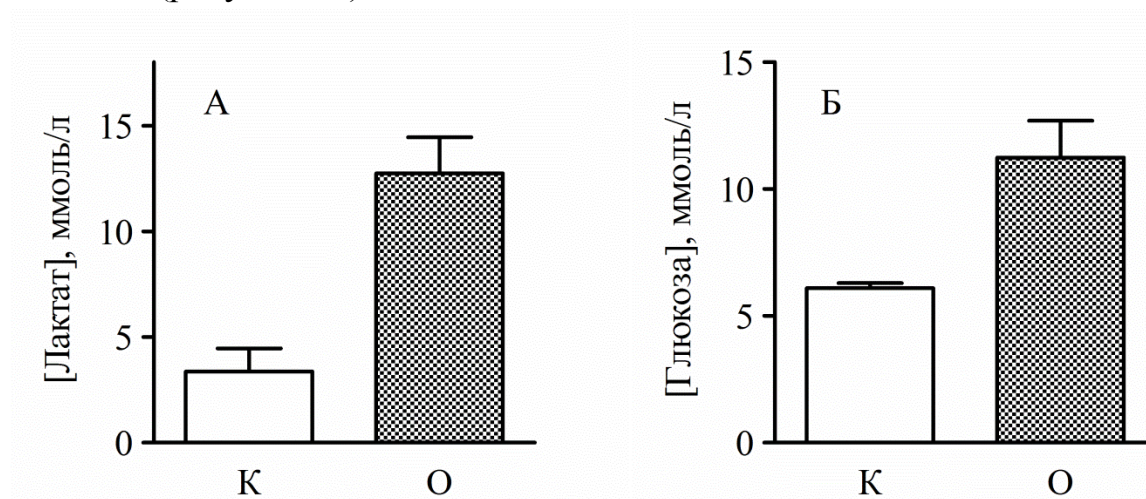


Рис. 1 – Концентрация лактата (А) и глюкозы (Б) в сыворотке крови крыс контрольной и опытной группы

Результаты исследований содержания производных тиамин в печени и головном мозге крыс при гипобарической гипоксии представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Содержание производных тиамин в головном мозге крыс при острой гипобарической гипоксии

Группа	Производные тиамин, нмоль/г ткани (в крови – нмоль/л)			
	тиамин	ТМФ	ТДФ	ТТФ
Контроль	0,44 ± 0,04	0,69 ± 0,09	8,29 ± 0,84	0,020 ± 0,002
Опыт	0,46 ± 0,03	0,72 ± 0,10	8,45 ± 0,88	0,027 ± 0,002*

* – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Из данных таблицы 1 видно, что в ткани головного мозга животных, испытавших острую гипоксию, существенно возростала концентрация ТТФ (на 35 %). Статистически значимых различий в содержании тиамин, ТМФ и ТДФ в мозге крыс контрольной и опытной групп при гипобарической гипоксии не выявлено.

Наблюдаемый эффект роста концентрации ТТФ в мозге под действием гипоксии, по-видимому, можно объяснить, исходя из представлений о некоферментной функции витамина В₁, которая несколько десятилетий обсуждалась исключительно в отношении нервной системы. Первые конкретные очертания идея об особой значимости тиамин для жизнедеятельности нервных клеток приобрела в начале 1970-х, когда Y. Itokawa & J.R. Cooper предположили, что биохимическая роль ТТФ связана с работой Na⁺-канала [3]. В последующем предлагался другой механизм участия ТТФ в процессах биоэлектrogenеза – активация макси-Cl⁻-канала [2]. Эти представления, однако, не получили дальнейшего развития. Сегодня уже понятно, что сфера действия ТТФ не ограничена рамками возбудимых тканей. Данное соединение синтезируется в клетках различных типов организмов – от бактерий до человека [6], выполняя, вероятно, более фундаментальную функцию, имеющую отношение к регуляторным процессам, либо сигнальным механизмам. В частности, было показано, что концентрация ТТФ резко возрастает в бактериальных клетках после переноса культуры из богатой среды в минимальную, содержащую метаболизируемый источник углерода, например, глюкозу, пируват или сукцинат [7]. На уровне общебиологической трактовки, безотносительно к молекулярным механизмам, этот феномен может рассматриваться как одно из проявлений адаптационного ответа клетки на изменившиеся условия внешнего окружения. Именно с позиций краткосрочной биохимической адаптации, вероятно, в общих чертах и следует объяснять тот факт, что при гипоксии содержание ТТФ в головном мозге возрастает. Если провести аналогию с результатами, полученными в экспериментах на бактериях [7], формально можно говорить о том, что рост концентрации ТТФ связан с ускоренной утилизацией глюкозы клетками мозга, когда на ранних этапах развития гипоксии адаптационные биохимические механизмы направлены на усиление гликолиза, с целью компенсации возникшего дефицита энергии. Существуют и другие косвенные данные, указывающие на связь ТТФ с метаболизмом глюкозы [1]. Поэтому не исключено, что ТТФ имеет отношение к координацией и регуляции энергетического обмена клетки.

Заключение. Результаты данной работы указывают на участие системы

метаболизма витамина В₁ в процессах краткосрочной адаптации при гипоксии. В связи с этим могут представлять интерес исследования антигипоксического действия производных тиамин.

Список литературы.

1. Макаричов, А.Ф. Тиаминтрифосфат: новый взгляд на некоферментную функцию витамина В₁ / А.Ф. Макаричов – Минск: Белорусская наука, 2008. – 433 с.
2. Bettendorff, L. Thiamine derivatives in excitable tissues: metabolism, deficiency and neurodegenerative diseases / L. Bettendorff, P. Wins // Recent Res. Devel. Neurochem. – 1999. – Vol. 2. – P. 37–62.
3. Cooper, J.R. The role of thiamine in nervous tissue / J.R. Cooper, J.H. Pincus // Neurochem. Res. – 1979. – Vol. 4. – P. 223–239.
4. Determination of thiamin and its phosphate esters in cultured neurons and astrocytes using an ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatographic method / L. Bettendorff [et al.] // Anal. Biochem. – 1991. – Vol. 198. – P. 52–59.
5. Metzler, D.E. Biochemistry. The chemical reactions of living cells / D.E. Metzler. – Harcourt/Academic Press, 2001. – Vol 1. – 937 p.
6. Thiamine triphosphate and thiamine triphosphatase activities: from bacteria to mammals / A.F. Makarchikov [et al.] // Cell. Mol. Life Sci. – 2003. – Vol. 60. – P. 1477–1488.
7. Thiamine triphosphate, a new signal required for optimal growth of *Escherichia coli* during amino acid starvation / B. Lakaye [et al.] // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279. – P. 17142–17147.

УДК 616.345-006.6-07

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ОПУХОЛЕЙ КИШЕЧНИКА

О.Е.Кузнецов, О.В.Горчакова

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Резюме. Опухоль кишечника распространенное заболевание с высоким наследственным риском. Предложен эффективный метод определения мутаций в гене hMLH1 методом полимеразной цепной реакции.

GENETIC DIAGNOSTICS OF COLORECTAL CANCER

O.Kuznetsov, O.Gorchakova

Grodno State Medical University, Belarus

Summary. Bowel cancer is a common disease with a high hereditary risk, referred to as "cancer families". An effective method for determining mutations in the hMLH1 gene by the PCR method is proposed.