

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 В<sub>1</sub> В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС**

*Т.Г.Кудырко<sup>1,2</sup>, И.М.Русина<sup>1,2</sup>, Т.А.Лучко<sup>1</sup>, И.К.Колос<sup>1,2</sup>, В.А.Гуринович<sup>1</sup>,  
А.Ф.Макарчиков<sup>1,2</sup>*

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

<sup>2</sup>*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 B<sub>1</sub> METABOLISM IN RAT BRAIN**

*T.G.Kudyrko<sup>1,2</sup>, I.M.Rusina<sup>1,2</sup>, T.A.Luchko<sup>1</sup>, I.K.Kolos<sup>1,2</sup>, V.A.Gurinovich<sup>1</sup>,  
A.F.Makarchikov<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds, NAS of Belarus,  
Grodno, Belarus*

<sup>2</sup>*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 В<sub>1</sub> в форме тиаминдифосфата (ТДФ) играет ключевую роль в энергетическом обмене клетки, выполняя коферментные функции в составе митохондриальных дегидрогеназных комплексов  $\alpha$ -кетокислот [5]. Получены также данные, которые указывают на связь метаболизма тиаминтрифосфата (ТТФ) и глюкозы [1]. Исходя из этого, есть основания полагать, что производные тиамин могут участвовать в краткосрочной адаптации при гипоксии. Влияние острой гипобарической гипоксии на метаболизм витамина В<sub>1</sub> 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 тиамин, отсутствуют.

Цель настоящей работы состояла в исследовании метаболизма витамина В<sub>1</sub> 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<sup>+</sup> «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<sup>+</sup>, 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 тиохрома 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 (Ø 4,1 × 150 мм, 5 мкм; Hamilton Co) с протекторным колоночным картриджем (Ø 2,3 × 25 мм). Мобильная фаза состояла из 50 мМ К-фосфатного буфера, рН 8,5, содержащего 25 мМ ТБА и 4 %-ный тетрагидрофуран. Производные тиохрома детектировали по флуоресценции ( $\lambda_{ex} = 365$  нм,  $\lambda_{em} = 433$  нм) [4].

Достоверность разности оценивали по t-критерию Стьюдента, используя программу GraphPadPrism 5.0. Данные представлены в виде средних значений ± 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 возрасла концентрация глюкозы (рисунок 1Б).

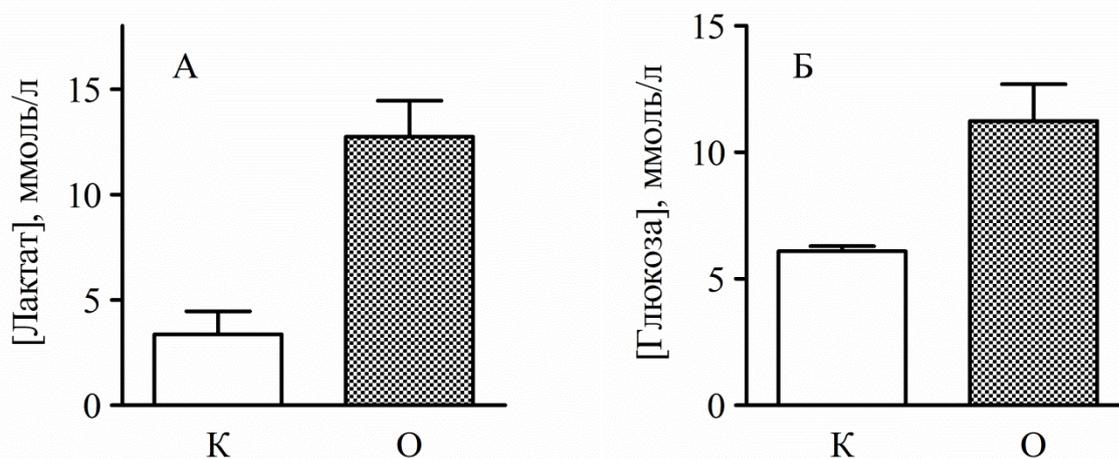


Рис. 1 – Концентрация лактата (А) и глюкозы (Б) в сыворотке крови крыс контрольной и опытной групп

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 В<sub>1</sub>, 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. Ito kawa & J.R. Cooper предположили, что биохимическая роль ТТФ связана с работой Na<sup>+</sup>-канала [3]. В последующем предлагался другой механизм участия ТТФ в процессах биоэлектrogenеза – активация макси-SГ-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 координации и регуляции энергетического обмена клетки.

**Заключение.** Результаты данной работы указывают на участие системы

метаболизма витамина В<sub>1</sub> в процессах краткосрочной адаптации при гипоксии. В связи с этим могут представлять интерес исследования антигипоксического действия производных тиамин.

#### **Список литературы.**

1. Макарович, А.Ф. Тиаминтрифосфат: новый взгляд на некоферментную функцию витамина В<sub>1</sub> / А.Ф. Макарович – 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.