

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДИНА**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Павлова Олександра Сергіївна

УДК 577.164.1:576.311.348.4

ДИСЕРТАЦІЯ

**«Ключові протеїни обміну тіаміну та функціональний стан нервових клітин
за різної забезпеченості організму вітаміном В₁»**

Спеціальність 03.00.04 – Біохімія

Галузь знань 091 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник: Пархоменко Юлія Михайлівна, доктор біологічних наук.

Київ – 2019

АНОТАЦІЯ

***Павлова О.С.* Ключові протеїни обміну тіаміну та функціональний стан нервових клітин за різної забезпеченості організму вітаміном В₁**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.04 «Біохімія». - Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2019.

Дисертаційна робота присвячена з'ясуванню залежних від забезпеченості клітин тіаміном змін у стані протеїнів нервових клітин, що беруть участь в обміні тіаміну (тіамінпірофосфокіназа та транспортер тіаміну), та окремих нейроспецифічних протеїнів цитоскелету (гліальний фібрилярний кислий протеїн та триплет нейрофіламентів).

У роботі продемонстровано, що всі досліджувані тіамін-дефіцитні стани характеризує зниження вмісту тіаміну в печінці та підтримання максимально можливого рівня ТДФ у головному мозку, що свідчить про пріоритетність нервової тканини в розподілі тіаміну. Виявлено, що глибокий аліментарний дефіцит тіаміну (авітаміноз) та хронічний алкоголізм спричиняють порушення Red-Ox балансу та розвиток у клітинах мозку ознак оксидативного стресу, наявність яких оцінювали за підвищенням вмісту активних форм кисню та зниженням рівня вільного глутатіону. Проте в умовах повільного зниження вмісту тіаміну в тканинах при тривалому недостатньому надходженні вітаміну до організму (гіповітаміноз) ознаки оксидативного стресу не спостерігались. Одноразове введення високої дози тіаміну щурам з аліментарним авітамінозом призводило до нормалізації загальних показників Red-Ox балансу в мозку, тоді як у випадку хронічного алкоголізму нормалізація показників виявилася можливою тільки за сумісного введення тіаміну з препаратом Метовітан, який є потужним антиоксидантом. Вперше продемонстрована регіональна чутливість ділянок головного мозку за рівнем транспортера тіаміну (THTR-1) у відповідь на дефіцит тіаміну (ТД) різної етіології, а саме: найбільш чутливою ділянкою

виявилася кора великих півкуль, адже вона першою демонструвала виразну компенсаторну відповідь на нестачу тіаміну – вже за умов гіповітамінозу рівень THTR-1 суттєво підвищувався, тоді як у мозочку та гіпокампі ще спостерігалася тенденція до зниження вмісту протеїну. Виявлено, що підвищення вмісту THTR-1, що відбувається на рівні експресії гену *slc19A2* у всіх досліджуваних відділах мозку за умов аліментарного авітамінозу, неможливо нівелювати одноразовим введенням високої дози тіаміну. Це свідчить про відсутність прямої залежності біосинтезу транспортера від надходження тіаміну в організм. Введення тіаміну також не відновлювало рівень ТДФ у випадку авітамінозу, і це дає підстави припустити, що саме рівень ТДФ в клітинах може бути фактором, регулюючим експресію транспортера THTR-1. Зниження вмісту протеїну THTR-1 на фоні порушення Red-Ox балансу, яке відбувається в мозку щурів за умов хронічного алкоголізму, можна нормалізувати лише сумісним введенням тіаміну та Метовітану, тоді як сам тіамін такого впливу не має. Встановлено, що за умов класичного В₁-авітамінозу відбувається суттєве пригнічення функціональності ТПК: знижується як активність ензиму у загальному гомогенаті мозку так і вміст цього протеїну у різних відділах мозку. Результати демонструють, що біосинтез ТПК має тіамін-залежний характер, оскільки введення тіаміну призводило до активації експресії гену *tpk-1* у всіх досліджуваних відділах що відбивалося на підвищенні вмісту протеїну. Водночас за умов розвитку гіповітамінозу спостерігалось коливання активності ензиму та вмісту ТДФ в межах +/- 20% від рівня контролю, а наприкінці розвитку цієї моделі вміст протеїну ТПК і активність цього ензиму є достовірно підвищеними. Тільки для цієї моделі дефіциту тіаміну, яка не супроводжується підвищенням рівня АФК, спостерігається тенденція до зворотної кореляції у активності і рівні ензиму та вмісті коензимної форми тіаміну.

Продемонстровано, що за умов хронічного споживання алкоголю спостерігається зниження рівня протеїну ТПК у всіх досліджуваних відділах мозку та зниження активності ензиму у гомогенаті мозку. Одноразове введення

тіаміну призводило до нормалізації рівня протеїну ТПК лише в корі та мозочку, в той час як вміст ТПК у гіпокампі і загальна активність ТПК повертались до рівня контролю лише після введення препарату Метовітан разом з тіаміном. Останнє спостереження свідчить про негативний вплив порушення Red-Ox балансу на активність ензиму, ймовірно за рахунок післятрансляційної модифікації протеїну. На клітинах мишачої нейробластоми з використанням імуноцитохімічного методу виявлено, що за умов ТД відбувається збільшення асоціації ТПК з плазматичною мембраною, що відображалось як ущільнення імуносигналу протеїну біля клітинної мембрани в клітинах з дефіцитом тіаміну в порівнянні з контрольними клітинами. Введення високої дози тіаміну в культуральне середовище до дефіцитних за тіаміном клітин призводило до рівномірного перерозподілу протеїну ТПК у клітині. Зокрема, ці зміни в асоціації ТПК з плазматичною мембраною можуть бути одним із факторів, що протидіє зниженню синтезу ТДФ і сприяє підтриманню більш-менш постійного його рівня в клітинах мозку за умов тіамін-дефіцитного стану. Підтверджено підвищену чутливість астроцитів до ТД різного ступеня – навіть за умов обмеженого надходження тіаміну спостерігається зниження рівня GFAP. Однак ці зміни зворотні, про що свідчить підвищення вмісту протеїну при одноразовому введенні вітаміну. При хронічному споживанні щурами алкоголю також знижується рівень GFAP у всіх досліджуваних відділах, однак коригуюча дія вітаміну можлива лише за умов сумісного введення з антиоксидантним препаратом. Зміни в рівні триплету нейрофіламентів (NF) спостерігаються тільки за умов глибокого аліментарного авітамінозу, причому зниження вмісту протеїнів відбувається тільки у мозочку, що підтверджує попередні повідомлення про підвищену чутливість цієї структури до дефіциту тіаміну. Проте введення тіаміну нівелює ці зміни та навіть стимулює підвищення вмісту NF. У корі великих півкуль та гіпокампі змін ані за умов патологічного стану, ані за корекції не спостерігається. Ці дані демонструють пріоритетність нейронів при розподілі тіаміну у головному мозку. Також результати продемонстрували,

що найбільш швидко відновлювальним відділом головного мозку (за рівнем GFAP та NF) виявився мозочок.

Отримані в дисертаційній роботі експериментальні результати мають важливе значення для медичної біохімії, фармакології, токсикології та медицини, оскільки розширюють сучасні уявлення про клітинно-молекулярні особливості розвитку тіамін-дефіцитних станів, некоензимних функцій тіаміну та підвищеної чутливості до ТД нервової системи. Завдяки виявленій зворотності патологічних змін введенням високих доз тіаміну та/або Метовітану обґрунтовано доцільність створення на основі препарату Метовітан його нового варіанта, збагаченого тіаміном. Продемонстрована відновлювальність нейроспецифічних структур цитоскелету, пригнічених за умов ТД станів, є підставою для науково обґрунтованих практичних рекомендацій щодо доцільності використання запропонованої комбінації препаратів (висока доза тіаміну та препарат Метовітан) для профілактики та/або лікування нейродегенеративних патологій, які індукуються або супроводжуються дефіцитом тіаміну.

Ключові слова: вітамін B₁, тіамін, дефіцит тіаміну, аліментарний авітаміноз B₁, аліментарний гіповітаміноз B₁, алкоголізм, нейродегенеративні захворювання, оксидативний стрес, транспортер тіаміну THTR-1, тіамінпірофосфокіназа, цитоскелет, астроглія, гліальний фібрилярний кислий протеїн (GFAP), нейрональний цитоскелет, триплет нейрофіламентів (NF).

Abstract

Pavlova O.S. Key proteins of thiamine metabolism and functional state of nerve cells with different supply of organism with B1 vitamin.

Thesis for PhD's degree by speciality – 03.00.04 «Biochemistry». – Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

The literature data convincingly suggest that almost all of known neurodegenerative pathologies are accompanied by the thiamine deficiency, expressed in varying degrees, and for the development of some of these pathologies, thiamine deficiency or disturbance of its metabolism may be an initiating factor. The foregoing suggests that deciphering the molecular mechanisms of thiamine's participation in maintaining the viability of nerve cells is an urgent issue in the aspect of neurodegenerative diseases prevention and treatment.

The thesis is dedicated to the analysis of changes in the state of nerve cells proteins (thiaminepyrophosphokinase and thiamine transporter) involved in the thiamine exchange and neurospecific proteins of the cytoskeleton (glial fibrillary acidic protein and triplet of neurofilament) dependent on thiamine supply.

In the work it is demonstrated that all of the studied thiamine-deficiency states are characterized by a thiamine content decrease in the liver and maintenance of the maximum possible level of TDP in the brain, which indicates the priority of the nerve tissue in the thiamine distribution and the importance of the normal state of its metabolism. It was found that deep alimentary deficiency of thiamine (avitaminosis) and chronic alcoholism lead to the oxidative stress development in brain cells, the presence of which was assessed by increasing the content of reactive oxygen species and free glutathione level reduction. However, the development of oxidative stress was not observed in the context of a slow decrease in the thiamine content in tissues caused by prolonged inadequate vitamin intake (hypovitaminosis). The one-time thiamine high dose administration to rats with alimentary avitaminosis led to the normalization of the oxidative stress general indicators in the brain, whereas in case of chronic alcoholism, the normalization of the indicators was possible only with the co-administration of thiamine with the Metovitan drug, which is a potent antioxidant.

For the first time regional sensitivity of the thiamine transporter (THTR-1) was demonstrated in response to the thiamine deficiency (TD) of different etiologies, namely: the most sensitive area was the cerebral cortex, since it was the first to

demonstrate a distinct compensatory response to thiamine deficiency. Under hypovitaminosis, the level of cortex THTR -1 significantly increased, while in the cerebellum and hippocampus, there was a tendency to decrease the protein content. It has been found that the compensatory increase in THTR-1 content, which occurs at the SLC19A2 gene expression level in all investigated brain regions under conditions of alimentary avitaminosis, cannot be offset by a single administration of a high thiamine dose. The thiamine administration did not restore the TDP level in case of avitaminosis either, and this suggests that the TDP level in cells may be an expression regulating factor of the THTR-1. Reducing the content of the THTR-1 protein that occurs in the rats' brains under chronic alcoholism may only be normalized by co-administration of thiamine and Metovitan, whereas thiamine itself does not have such an effect.

It has been established that under the classical B₁-avitaminosis condition there was a significant inhibition of TPK function: it decreases both the enzyme activity in the general brain homogenate and the protein content in different parts of the brain. The thiamine administration resulted in the TPK-1 gene expression activation in all investigated departments, which was reflected in an increase in protein content. At the same time, under the conditions of hypovitaminosis development, fluctuations in the enzyme activity and the content of TDP in the range of +/- 20% of the control level were observed. At the end of this model development, the protein content of TPK and the enzyme activity are significantly increased. Only for this model of thiamine deficiency, which is not accompanied by an increase in the ROS level, there is a tendency to the inverse correlation in the enzyme state and the content of the thiamine coenzyme form. It has been shown that under the conditions of chronic alcoholic intoxication there is a decrease in the TPK protein content in all studied brain sections and decreased enzyme activity in the brain homogenate. A single dose of thiamine resulted in the TPK protein level normalization in the cortex and the cerebellum only, while the TPK content in the hippocampus and the total TPK activity returned to the control level only after the Metovitan and thiamine co-administration. These data

suggest a negative effect of oxidative stress on enzyme activity, probably due to the posttranslational modification of the protein.

Using the immunocytochemical method in mice neuroblastomas cell line it was discovered that under the TD conditions there was an increase in the TPK association with a plasma membrane, which was reflected as the cell-membrane protein seal in cells with thiamine deficiency compared to control cells. The administration of a high thiamine dose in the culture medium resulted in redistribution of TPK protein in the cell. In particular, these changes in the TPK association with a plasma membrane may be one of the factors that counteract the decrease in the TDP synthesis and contributes to maintaining a more or less constant TDP level in brain cells under thiamine-deficiency state conditions.

The increased astrocytes sensitivity to TD of varying degrees has been confirmed - even with limited thiamine admission, GFAP inhibition is observed. However, these changes are reversible, as evidenced by an increase in protein content caused by one-time administration of vitamin. In conditions of acute ethanol intoxication, it is possible to restore glial cells with a high dose of thiamine administration, whereas in the chronic alcoholism case vitamin corrective effect is possible only under conditions of co-administration with an antioxidant drug. The results also showed that the cerebellum was the fastest restorative department (at the level of GFAP), while the hippocampus showed the least reactivity. Changes in the neurofilaments level are observed only under conditions of deep alimentary avitaminosis, and the decrease in protein content occurs only in one of the three investigated divisions - in the cerebellum, which confirms previous reports of the increased sensitivity of this structure to thiamine deficiency. However, the thiamine administration reduces these changes and even stimulates the increase in the NF content. In the cerebral cortex and the hippocampus there are no changes under the pathological state conditions. These data demonstrate the priority of neurons in the distribution of thiamine in the brain.

The experimental results obtained in the study are important for medical biochemistry, pharmacology, toxicology and medicine, as they broaden the current understanding of the cellular and molecular peculiarities of the thiamine-deficient states development, non-coenzymatic thiamine functions, and increased sensitivity of the nervous system to TD. Due to the revealed reversal of pathological changes with the high doses of thiamine administration and / or Metovitan, it was substantiated that it is advisable to create a new variant enriched with thiamine on the drug Metovitan basis. The renewal of neurospecific cytoskeleton structures suppressed under conditions of TD states is a basis for scientifically substantiated practical recommendations on the feasibility of using the proposed drug combination (a high thiamine dose and drug Metovitan) for the prevention and / or treatment of neurodegenerative pathologies induced or accompanied by thiamine deficiency.

Key words: vitamin B₁, thiamine, thiamine deficiency, alimentary vitamin B₁ avitaminosis, alimentary vitamin B₁ hypovitaminosis, alcoholism, neurodegenerative diseases, oxidative stress, thiamine THTR-1 transporter, thiaminepyrophosphokinase, cytoskeleton, astroglia, glial fibrillar acidic protein (GFAP), neuronal cytoskeleton, Neurofilaments Triplet (NF).

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. Pavlova O.S., Tykhomyrov A.A., Mejenskaya O.A., Stepanenko S.P., Chehivska L.I., Parkhomenko Yu.M. High thiamine dose restores levels of specific astroglial proteins in rat brain astrocytes affected by chronic ethanol consumption / Ukrainian Biochemical Journal . 2019, 91 (4). – 41-49.
2. Parkhomenko, Y.M., Pavlova, A.S., Mejenskaya, O.A., Stepanenko, S.P., Chekhivska, L.I. Thiamine diphosphate synthesis and redox state indicator in the rat brain during B 1 hypovitaminosis/ Ukrainian Biochemical Journal . – 2017 89 (5).- 84-95;
3. Pavlova, A.S. , Stepanenko, S.P. , Chekhovskaya, L.I., Tikhomirov, A.A. , Parkhomenko, Y.M. Dependence of Vitamin B 1 Metabolism and the State of

Astroglia in the Rat Brain on the Supply with this Vitamin / Neurophysiology, 201 , 48 (5). – 336-345.

4. Parkhomenko, Y.M. , Pavlova, A.S. , Mezhenkaya, O.A. Mechanisms Responsible for the High Sensitivity of Neural Cells to Vitamin B 1 Deficiency // Neurophysiology. / 2016 48 (6).- С.429-448.

5. Tykhomyrov A.A., Pavlova A.S., Nedzvetsky V.S. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP): on the 45th Anniversary of Its Discovery// Neurophysiology – 2016 – 48, №1.- С. 54-71;

6. Павлова О.С, Степаненко С. П., Чехівська Л. І., Пархоменко Ю. М. Обмін тіаміну за умов хронічного алкоголізму та його корекції // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. - 2016.- 74(спец). – С.75-81.

7. Меженская О.А., Павлова А.С., Степаненко С.П., Чеховская Л.И., Пархоменко Ю.М. Активности малат- и глутаматдегидрогеназы в тканях зависят от обеспеченности организма витамином В₁?/ Матер. Межд. Симп. «Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии». г.Гродно, Беларусь, 2018. .С.369-376.

Апробація матеріалів дисертації:

1. Parkhomenko Yu.M., Pavlova O.S., Mezhenka O.O., Stepanenko S.P., Chehivska L.I. Do oxidized derivatives of thiamine participate in regulation of its metabolism?// Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, 30 вересня – 4 жовтня 2019, м. Тернопіль «Медична та клінічна хімія».-2019.-т. 21, 3(80), с. 232.

2. О. Pavlova, Yu. Parkhomenko. THIAMINE TRANSPORTER THTR-1 EXPRESSION INCREASES UNDER NUTRITIONAL THIAMINE DEFICIENCY CONDITIONS AND DOES NOT DEPEND DIRECTLY FROM THIAMINE INPUT INTO THE ORGANISM//Матеріали конференції – конкурсу молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2015», 21-22 березня 2019 року, Укр. біохім. Журн.- 2019

3. Parkhomenko Yu., Protasova Z., Pavlova A., Yanchiy O. Thiamine derivatives use to investigate the modulator role of thiamine in the biosynthesis of acetylcholine from pyruvate// The 8th International Conference on thiamine: From catalysis to pathology, 2014.- Liege, Belgium.- P.30.

4. О.С. Павлова, А.О. Тихомиров. Зміни рівня тіамінпірофосфокінази та стан астроглії у головному мозку щурів за умов аліментарного В 1 дефіциту та його корекції // Матеріали конференції – конкурсу молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2015», 23-24 квітня 2015 року, Укр. біохім. Журн.- 2015- С.49.

5. Павлова А. С., Тихомиров А. А., Пархоменко Ю.М. Ключевые протеины обмена тиамин и состояние астроглии головного мозга крыс при алиментарном В 1 -дефиците и его коррекции // Материалы третьей международной конференции «Актуальные проблемы современной биохимии и клеточной биологии», 24-25 сентября 2015 г., Днепропетровск, - С. 79.

6. O. Pavlova, A. Tykhomyrov, Yu. Parkhomenko. The thiamine metabolism proteins and rat brain astroglial state at alimentary B 1 deficit and its correction// Abstracts of X parnas conference young scientist forum “Molecules in the living cell and innovative medicine”, 10 th -12 th July 2016, Acta Biochimica Polonica. - 2016.- 63 suppl.1 – P.30

ЗМІСТ:

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	16
ВСТУП	18
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	26
1.1. ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ ЩОДО ТІАМІНУ ТА ЙОГО БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ПОХІДНИХ	26
1.1.1. Відкриття тіаміну його властивості, біосинтез та добова потреба організму людини	26
1.1.2. Біологічно активні похідні тіаміну	27
1.2. МЕТАБОЛІЗМ ТІАМІНУ В ОРГАНІЗМІ ССАВЦІВ ТА НА КЛІТИННОМУ РІВНІ	31
1.2.1. Засвоєння вітаміну організмом: всмоктування та перенесення з кров'ю.	31
1.2.2. Перетворення тіаміну на біологічно активні форми. Характеристика тіамінпірофосфокінази.	33
1.3. ГЕНЕТИЧНІ ПОРУШЕННЯ ОБМІНУ ТІАМІНУ.	35
1.3.1. Дефіцит транспортеру тіаміну THTR1	35
1.3.2. Дефіцит транспортеру тіаміну THTR2	36
1.3.3. Дефіцит мітохондріального транспортера тіаміндифосфату	37
1.3.4. Дефіцит тіамінпірофосфокінази	38
1.4. ТІАМІН-ДЕФІЦІТНІ СТАНИ	39
1.4.1. Прояви нестачі тіаміну	39
1.4.2. Аліментарний авітаміноз тіаміну	39
1.4.3. Аліментарний гіповітаміноз тіаміну	40
1.4.4. Синтетичні похідні тіаміну, що використовуються як його антагоністи	41

1.4.5. Хронічний алкоголізм як ефективна модель дефіциту тіаміну	43
1.5. РОЛЬ ТІАМІНУ У НЕРВОВІЙ СИСТЕМІ	44
1.5.1. Основні гіпотези щодо нейротропної функції тіаміну	44
1.5.1.1. Мембранна гіпотеза	44
1.5.1.2. Метаболічна гіпотеза	44
1.5.2. Значення тіаміну у функціонуванні нервової системи	45
1.5.2.1. Тіамін та астроглія	46
1.5.2.2. Тіамін та нейрони	47
1.6. Нейродегенеративні захворювання, що супроводжуються дефіцитом тіаміну	47
1.6.1. Хвороба Альцгеймера	48
1.6.2. Синдром Верніке-Корсакова	50
1.6.3. Хвороба Паркінсона	52
1.7. АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ ЩОДО НЕЙРОТРОПНОСТІ ТІАМІНУ	54
1.7.1. Тіамін та цитоскелет	54
1.7.1.1. Тіамін та гліальний фібрилярний кислий протеїн	54
1.7.1.2. Тіамін та триплет нейрофіламентів	55
Розділ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	58
2.1. Тваринні та клітинні моделі що використовувались для розвитку тіамін-дефіцитних станів та схеми введення коригуючих речовин.	58
2.1.1. Моделі аліментарного дефіциту тіаміну	58
2.1.2. Модель хронічного алкоголізму	59
2.1.3. Клітинна модель дефіциту тіаміну	59
2.2. Матеріали та обладнання	59

2.3. Методи досліджень	60
2.3.1. Кількісне визначення протеїну	60
2.3.2. Визначення вмісту тіаміну	61
2.3.3. Визначення параметрів окисно-відновного стану організму	61
2.3.4. Вимірювання вмісту ТДФ та активності ТПК	61
2.3.5. Зв'язування [^{14}C]тіаміну плазматичною мембраною синапсом	62
2.3.6. Електрофорез та Вестерн-блот аналіз	62
2.3.7. Імуногістохімія	63
2.3.8. Імуноцитохімія	64
2.3.9. Отримання фракцій РНК	64
2.3.10. Синтез к-ДНК (зворотня полімеразна ланцюгова реакція)	65
2.3.11. Кількісна полімеразна ланцюгова реакція	66
2.3.12. Методи статистичного аналізу	67
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	68
3.1. Загальна характеристика тваринних моделей ТД, використаних в роботі	68
3.1.1. Аліментарний авітаміноз В1 (В1-Аv)	69
3.1.2. Аліментарний гіповітаміноз В1 (В1-Нv)	71
3.1.3. Хронічний алкоголізм	75
3.2. THTR-1 за умов різної забезпеченості організму тіаміном	78
3.2.1 Вміст та експресія THTR-1 за умов аліментарного авітамінозу.	79
3.2.2.Вміст THTR-1 за умов гіповітамінозу	81
3.2.3 Вміст THTR-1 за умов хронічного алкоголізму.	83
3.3 ТПК за умов різної забезпеченості організму тіаміном та	87

коригування дефіцитних станів.

3.3.1 Активність, вміст та експресія ТПК за умов аліментарного авітамінозу.	88
3.3.2 Активність та вміст ТПК за умов аліментарного гіповітамінозу	91
3.3.3 Активність та вміст ТПК за умов хронічного алкоголізму	94
3.3.4 Локалізація ТПК за умов ТД та його корекції на культурі клітин мишачої нейробластоми.	97
3.4. Нейроспецифічні протеїни цитоскелету за умов різної забезпеченості організму тіаміном	100
3.4.1. Актин за умов дефіциту тіаміну	101
3.4.2 Гліальний фібрилярний кислий протеїн (GFAP) за умов Av-T, Hv-T та їх корекції	102
3.4.3 Гліальний фібрилярний кислий протеїн (GFAP) за умов хронічного алкоголізму та його корекції.	106
3.4.4. Вміст триплету нейрофіламентів (NF) за умов ТД та його корекції.	109
ЗАКЛЮЧЕННЯ	112
ВИСНОВКИ	120
Список використаних джерел	123

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ALP	—	лужна фосфотаза
ApoPDC	—	апоензим піруватдегідрогенази
Av-T	—	аліментарний авітаміноз
GFAP	—	гліальний фібрилярний кислий протеїн
GLT-1 , GLAST	—	транспортери глутамату
HPLC	—	високоєфективна рідинна хроматографія
HPRT	—	гіпоксантин-гуанінфосфорибозилтрансфераза
Hv-T	—	аліментарний гіповітаміноз
NF	—	триплет нейрофіламентів
NF-H	—	важкий ланцюг триплету нейрофіламентів
NF-L	—	легкий ланцюг триплету нейрофіламентів
NF-M	—	середній ланцюг триплету нейрофіламентів
PBS	—	фосфатний буфер
PD	—	хвороба Паркінсона
PFA	—	Параформальдегід
RFC1	—	фолатний транспортер
SDS	—	додецилсульфат натрію
THTR-1	—	транспортер тіаміну 1
THTR2	—	транспортер тіаміну 2
АД	—	хвороба Альцгеймера

АМФ	—	Аденозинмонофосфат
АТТФ	—	аденильований тіамінтрифосфат
АТФ	—	Аденозинтрифосфат
АФК	—	активні форми кисню
АХ	—	Ацетилхолін
ДНК	—	дезоксірибонуклеїнова кислота
НАДН	—	Нікотинаміддинуклеотид
ОГДК	—	оксиглутаратдегідрогеназний комплекс
ПААГ	—	поліакриламідний гель
ПДК	—	піруватдегідрогеназний комплекс
ПЛР	—	полімеразна ланцюгова реакція
РНК	—	рибонуклеїнова кислота
T ⁺	—	катіонна форма тіаміну
ТД	—	дефіцит тіаміну
ТДФ	—	Тіаміндифосфат
ТМФ	—	Тіамінмонофосфат
ТПК	—	Тіамінпірофосфокіназа
ТСА	—	трихлороцтова кислота
ТТФ	—	Тіамінтрифосфат
ЦНС	—	центральна нервова система

ВСТУП

Актуальність теми дослідження. На сьогодні, майже через століття після відкриття вітаміну В₁ (тіаміну) все ще не існує повного розуміння надзвичайно високої чутливості нервових клітин до дефіциту цього вітаміну (Yu. M. Parkhomenko, Pavlova, & Mezhenkaya, 2016). Між тим накопичені дані літератури переконливо свідчать про те, що майже всі відомі нейродегенеративні патології супроводжуються тою чи іншою мірою вираженим дефіцитом тіаміну (Haas, 1988; Mouton-Liger et al., 2015), а для розвитку деяких з цих патологій дефіцит тіаміну або порушення його обміну можуть бути ініціюючим фактором (Gibson et al., 2016; Pan et al., 2016; Rao, Richardson, & Butterworth, 1993). Вищевказане свідчить про те, що розшифрування молекулярних механізмів участі тіаміну у підтриманні життєздатності нервових клітин є актуальним питанням в аспекті профілактики нейродегенеративних захворювань та їх лікування.

З точки зору функціональної біохімії роль тіаміну в клітинному метаболізмі тварин вивчена досить добре (Bunik et al., 2015; Manzetti, Zhang, & van der Spoel, 2014). Відомо, що похідне тіаміну - тіаміндіфосфат (ТДФ), є коензимом декількох ензимів, які забезпечують обмін вуглеводів, а порушення функції цих ензимів призводять до розвитку оксидативного стресу (Gibson & Zhang, 2002). І самі ТДФ-залежні ензими, і основні реакції, що каталізуються цими ензимами, досліджені і описані досить детально. Але спроба пояснити феномен високої нейроактивності тіаміну лише з позиції його коензимної функції не виявилась успішною (Bâ, 2008; Yu. M. Parkhomenko et al., 2016; Островский Ю. М., 1975).

На основі аналізу даних літератури та результатів досліджень нами зроблене припущення, що не існування якихось ще невідомих тіамін-залежних біохімічних реакцій в нервових клітинах, а саме особливості структурно-функціональної організації нервових клітин лежать в основі високої чутливості

нервової тканини до дефіциту тіаміну. В цьому аспекті становить інтерес той факт, що кілька груп дослідників, незалежно одна від одної, постулювали наявність в нервових клітинах спеціального пулу тіаміну та його похідних (Berman & Fishman, 1975; Bettendorff, 1996). Згідно нашого припущення, циркуляція цього пулу між внутрішньоклітинним простором і пресинаптичною щілиною пов'язана із функціональним станом збудливої мембрани і взагалі з функціонуванням нервових клітин. Вищевказану гіпотезу підтримують спостереження, які свідчать, що за умов дефіциту тіаміну в організмі коливання вмісту ТДФ в клітинах мозку в межах більш-менш постійного рівня забезпечується перманентною перекачкою вітаміну в мозок з інших органів (кров, печінка, нирки та інш.) і тільки після виснаження депо тіаміну в інших органах починаються зміни його обміну в клітинах мозку (Туманов, Требухіна, 1987). Інші дослідники вважають, що некоензимні ефекти тіаміну пов'язані зі взаємодією тіаміну та його похідних з біологічними мембранами (Bâ, 2008).

Вищенаведені факти та припущення вказують на те, що для з'ясування молекулярних механізмів високої нейроактивності вітаміну B₁ необхідно дослідити взаємодію його біологічно активних похідних та, ймовірно, протеїнів його обміну із структурними протеїнами, що забезпечують динамічність нервових клітин, насамперед – протеїнами цитоскелету.

Дані літератури вказують на тканинну специфічність деяких протеїнів цитоскелету. Для нейроектодермальних клітин мозку є характерними два типи проміжних філаментів, які утворюються нейроспецифічними протеїнами: нейрофіламенти (триплет протеїнів з молекулярною масою 70, 160 і 210 кДа), і гліальні філаменти (гліальний фібрилярний кислий протеїн – GFAP).

Оскільки взаємозв'язки між розвитком дефіциту тіаміну та процесами нейродегенерації залишаються не з'ясованими повністю, виявлення протеїнів, що є чутливими до зміни рівня забезпеченості вітаміном B₁ у організмі, може стати ефективним методичним підходом до розуміння механізмів дегенеративних змін у нервовій системі.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась у 2014-2017 рр. в рамках наукових тем відділу біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України: 1) «Роль вітамінів А, Е, В₁, РР, D₃, убіхінону та їх коензимів у забезпеченні функціонування спеціалізованих клітин за норми та за умов ініціації їх загибелі» (2012-2016 рр., тема № 4, державний реєстраційний номер 0112U002625), розділ 3 «Вивчення механізмів регуляції обміну та функціонування вітаміну В1 та його похідних в нервових клітинах за нейродегенеративних патологій». 2) «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» (2012-2016 рр., тема № 15, державний реєстраційний номер 0112U002624), підрозділ 2 «Взаємодія систем регуляції вітамінами та коензимами внутрішньоклітинного метаболізму; вивчення фундаментальних основ процесів функціонування біологічних систем і регуляції вітамінами Е, В₁, РР, коензимами та їх біологічно активними похідними внутрішньоклітинного метаболізму в нормі та за патології». Роботу було підтримано також програмою "FEBS Collaborative Experimental Scholarships for Central & Eastern Europe" (2017 р.) та стипендією за результатами конкурсу на кращу наукову роботу Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (2015 та 2016 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи було оцінити навантаження та характер змін в стані протеїнів нервових клітин, що беруть участь в обміні тіаміну, а саме, в транспортуванні тіаміну через плазматичну мембрану і синтезі ТДФ в клітині, та окремих нейроспецифічних протеїнів цитоскелету за різної забезпеченості організму тіаміном.

Відповідно до мети були поставлені наступні завдання:

1. Відпрацювати моделі дефіциту тіаміну на тваринах та охарактеризувати їх за загальними показниками окисно-відновного стану (рівень АФК та SH-груп), вмістом тіаміну у печінці та ТДФ у мозку.

2. За умов дефіциту тіаміну різної етіології (аліментарний авітаміноз та гіповітаміноз, хронічний алкоголізм) дослідити вміст та експресію транспортера тіаміну (THTR-1) у трьох відділах мозку: корі, мозочку, гіпокампі.
3. Оцінити зворотність виявлених змін у рівні та експресії транспортеру тіаміну за умов дефіциту тіаміну різної етіології шляхом одноразового введення високої дози тіаміну.
4. Дослідити активність, вміст протеїну, експресію мРНК тіамінпірофосфокінази (ензиму, відповідального за синтез ТДФ), за умов дефіциту тіаміну різної етіології у трьох вищевказаних відділах мозку.
5. Оцінити зворотність виявлених змін у стані ТПК за умов дефіциту тіаміну різної етіології шляхом одноразового введення високої дози тіаміну.
6. На культурі клітин дослідити вплив дефіциту тіаміну на локалізацію ТПК у клітині.
7. Дослідити вплив забезпеченості клітин тіаміном на стан окремих нейроспецифічних протеїнів цитоскелету астроглії та нейронів у трьох відділах мозку: корі, мозочку, гіпокампі.

Об'єкт дослідження: Протеїни метаболізму тіаміну нервової тканини, а саме, транспортер тіаміну, та тіамінпірофосфокіназа, та нейроспецифічні протеїни цитоскелету.

Предмет дослідження: Дефіцит тіаміну як ініціюючий фактор у механізмах розвитку нейродегенерації, гліальний фібрилярний кислий протеїн та триплет нейрофіламентів як динамічні структури нервових клітин, які є чутливими до нестачі тіаміну.

Для реалізації завдань було використано наступні **методи:**

- біохімічні (спектрофотометрія, флюорометрія) для оцінки загального вмісту протеїну, вмісту тіаміну у печінці, рівня ТДФ та активності ТПК у мозку та оцінку параметрів окисно-відновного стану клітин,

- імунохімічні (вестерн-блот аналіз, імуноцито- та імуногістохімія): для оцінки вмісту протеїнів обміну тіаміну та нейроспецифічних протеїнів цитоскелету,
- методи молекулярної біології (полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі): для визначення рівня експресії цільових генів,
- конфокальна мікроскопія: для встановлення локалізації цільових протеїнів,
- методи математичної статистики: для обробки та аналізу результатів досліджень за допомогою комп'ютерних програм MS Excel та Origin.

Наукова новизна одержаних результатів. Отримані у дисертаційній роботі експериментальні результати поглиблюють та розширюють сучасні уявлення про клітинно-молекулярні особливості розвитку тіамін-дефіцитних станів, некоензимні функції тіаміну та підвищену чутливості до ТД нервової системи.

Вперше проведено комплексне дослідження стану протеїнів, від яких залежить швидкість синтезу ТДФ у нервових клітинах, а саме, транспортера тіаміну (THTR-1) і тіамінірофосфокінази (ТПК) за умов дефіциту тіаміну (ТД) різної етіології. Виявлено протилежно спрямовані зміни в рівні та експресії цих двох протеїнів за умов B_1 гіпо- та авітамінозу. А саме, спостерігається підвищення вмісту THTR-1, що відбувається на рівні експресії гену *slc19A2* у всіх досліджуваних відділах мозку у відповідь на аліментарний авітаміноз. За цих же умов відбувається суттєве пригнічення функціональності ТПК: знижується активність ензиму у загальному гомогенаті мозку, а також вміст ензиму і його мРНК у різних відділах мозку. У випадку моделі хронічного алкоголізму, яка також є визнаною моделлю дефіциту тіаміну, спостерігається зниження у визначених параметрах обох протеїнів у всіх трьох досліджуваних відділах мозку (корі великих півкуль, гіпокампі та мозочку). Це спостереження свідчить про іншу, ніж за умов авітамінозу, етіологію виникнення дефіциту тіаміну при хронічному вживанні алкоголю.

Повне або часткове відновлення спостережуваних змін в параметрах стану протеїнів, що досліджуються, при одноразовому введенні високої дози тіаміну спостерігається лише за умов відсутності в тканині мозку ознак окислювального стресу (ОС). Результати, отримані на моделі В₁-авітамінозу свідчать, що порушення Red-Ox балансу у бік розвитку окислювального стресу (ОС) може спричиняти гальмування біосинтезу ТПК на етапі трансляції цього протеїну, оскільки за цих умов знижується рівень протеїну, але не мРНК. Рівень ТПК частково відновлюється одноразовим введенням високої дози тіаміну.

Встановлено, що за умов ТД відбувається часткова зміна клітинної локалізації ТПК, а саме, збільшення її асоціації з плазматичною мембраною, що може бути наслідком змін в клітинних структурах. Введення високої дози тіаміну до ТД клітин призводить до рівномірного перерозподілу забарвлення у клітині.

Порівняльне дослідження окисно-відновного стану в тканині мозку за умов В₁-авітамінозу і В₁-гіповітамінозу продемонструвало, що режим надходження тіаміну до клітин мозку є важливим для їх функціонування: обмежене але постійне надходження тіаміну попереджає розвиток ознак оксидативного стресу, що підтверджує можливість прямої взаємодії молекули тіаміну з вільними радикалами за фізіологічних умов.

Підтверджено підвищену чутливість астроцитів до ТД різного ступеня – навіть за умов обмеженого надходження тіаміну спостерігається пригнічення GFAP. Вперше продемонстровано, що ці зміни обумовлені дефіцитом тіаміну, про що свідчить їх зворотність при одноразовому введенні вітаміну. Результати продемонстрували, що найбільш швидко відновлювальним відділом головного мозку (за рівнем GFAP) виявився мозочок. Зміни в рівні триплету нейрофіламентів (NF) спостерігаються тільки за умов глибокого аліментарного авітамінозу, і тільки в одному з трьох досліджуваних відділів - у мозочку. При введенні тіаміну у першу чергу відновлюється рівень триплету, тоді як вміст

астроцитарного маркеру підвищується лише частково, що свідчить про пріоритетність нейронів при розподілі тіаміну у головному мозку.

Практична значимість. Отримані у дисертаційній роботі експериментальні результати мають важливе значення для медичної біохімії, фармакології, токсикології та медицини, оскільки поглиблюють та розширюють сучасні уявлення про клітинно-молекулярні особливості розвитку тіамін-дефіцитних станів, некоензимних функцій тіаміну та підвищеної чутливості до ТД нервової системи. Завдяки виявленій зворотності патологічних змін введенням високих доз тіаміну та/або Метовітану обґрунтовано доцільність створення на основі препарату Метовітан нового його варіанта, збагаченого тіаміном. Продемонстрована відновлювальність нейроспецифічних структур цитоскелету, пригнічених за умов ТД станів, є підставою для науково обґрунтованих практичних рекомендацій щодо доцільності використання запропонованої нами комбінації препаратів (висока доза тіаміну та препарат Метовітан) для профілактики та/або лікування нейродегенеративних патологій, котрі індукуються або супроводжуються дефіцитом тіаміну.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем самостійно здійснено пошук та аналіз сучасних джерел літератури відповідно до теми дисертаційної роботи, здійснено підбір та опрацювання молекулярно-біологічних та біохімічних методів дослідження, виконано експериментальну частину роботи протягом 2014-2017 рр., статистично проаналізовано, оформлено та узагальнено одержані результати досліджень. В підготовці моделей дефіциту тіаміну та в визначенні активності ТПК за ензиматичним методом брали участь м.н.с. Степаненко С.П. та м.н.с. Чехівська Л.І. Дослідження змісту GFAP та NF у відділах головного мозку виконані за участю к.б.н. А.О. Тихомирова. Планування та розробка загальної концепції роботи, аналіз та обговорення отриманих експериментальних даних, формулювання основних положень і висновків дисертаційної роботи, підготовка до друку наукових публікацій проводились спільно з науковим керівником д.б.н., Пархоменко Ю. М. Проведення кількісної ПЛР та імуноцитохімічного аналізу

ТПК виконувалось здобувачем у лабораторії GIGA-Neuroscience, м. Льєж, Бельгія під керівництвом проф. Беттендорфа Л.

Апробація результатів дисертації. Основні наукові положення дисертаційної роботи були представлені у вигляді усних та постерних доповідей на конференціях: The 8th International Conference on thiamine: From catalase to pathology, 2014.- Liege, Belgium, конференція – конкурс молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2015»- Київ, Україна, «Актуальные проблемы современной биохимии и клеточной биологии», 24-25 сентября 2015 г., Днепропетровск, X parnas conference young scientist forum “Molecules in the living cell and innovative medicine”, 10 th -12 th July 2016, конференція – конкурс молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2019»- Київ, Україна.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 7 статей у наукових фахових журналах, та 6 тез доповідей у збірниках матеріалів міжнародних та вітчизняних наукових конгресів, конференцій та з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, результатів роботи та їх обговорення, заключення, висновків та списку використаних джерел (250 найменувань).

Дисертацію викладено на 141 сторінці друкованого тексту, загальна кількість ілюстрацій – 2 таблиці та 34 рисунки.

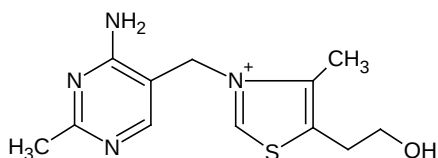
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ ЩОДО ТІАМІНУ ТА ЙОГО БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ПОХІДНИХ

1.1.1. Тіамін: властивості, біосинтез та добова потреба організму людини

Саме з відкриття та дослідження тіаміну почався розвиток вітамінології як галузі науки. Вперше в чистому вигляді тіамін був одержаний з висівок рису в 1926 році, а у 1937 році Уільямс та співробітники остаточно визначили хімічну природу і встановили емпіричну формулу цього вітаміну, а дещо згодом був проведений і хімічний синтез сполуки (Itokawa, 1996), (Lonsdale, 2006).

Молекула тіаміну представляє собою систему з піримідинового (2-метил-5-оксиметил-6-амінопіримідин) та тiazолового (4-метил-5-оксиетилтіазол) кілець, з'єднаних метиленовою групою:



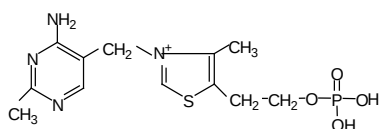
тіамін

В організм людини і тварин тіамін надходить з їжею у вільному та зв'язаному вигляді. Добова потреба для дорослих становить 2-3 мг, для дітей - 0,5-2 мг. Сумарний вміст тіаміну в організмі людини, нормально забезпеченої вітаміном, складає близько 30 мг, при цьому в цільній крові 3-16 мкг %, в інших тканинах: серці - 360, печінці - 220, мозку - 160, легенях - 150, нирках - 280, м'язах - 120, наднирниках - 160, шлунку - 56, шкірі - 52 мкг % (Островский Ю. М., 1979). Згідно даним, одержаним в дослідках на щурах (Островский Ю. М., 1975), близько половини тіаміну, що знаходиться в організмі, припадає на скелетні м'язи, 40 % - на внутрішні органи, з них 15-20 % містить печінка. *De novo* вітамін В₁ синтезується в клітинах більшості прокаріотів, в деяких еукаріотах, таких як рослини та дріжджі. Синтез відбувається шляхом складного механізму: піримідинове та тiazолове кільця синтезуються окремо, та під впливом

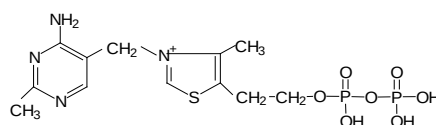
тіамінфосфатсинтази об'єднуються з утворенням тіамінмонофосфату (Begley, Chatterjee, Hanes, Hazra, & Ealick, 2008; Webb, Marquet, Mendel, Rébeillé, & Smith, 2007). Біосинтез тіаміну регулюється рибосвітчами – висококонсервативними некодуючими елементами на 5'-кінці мРНК, які при зв'язуванні невеликих молекул метаболітів (наприклад, деякі вітаміни, амінокислоти, нуклеотидні основи) зазнають конформаційних змін, і як наслідок контролюють експресію кодуючих ділянок генів (Miranda-Ríos, 2007; Soukup & Soukup, 2004; Vitreschak, Rodionov, Mironov, & Gelfand, 2004). Рибосвітч Thi-box, який зв'язується з коензимною формою вітаміну – тіаміндифосфатом це один з перших відкритих рибосвітчей (Bettendorff, Wins, & Lesourd, 1994). Він представлений в організмах, що відносяться до усіх трьох доменів (архей, прокаріотів і еукаріотів), причому на сьогодні він є єдиним ідентифікованим у еукаріот.

1.1.2. Біологічно активні похідні тіаміну

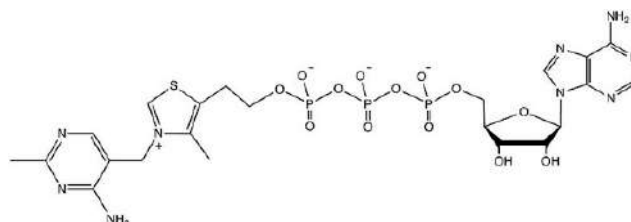
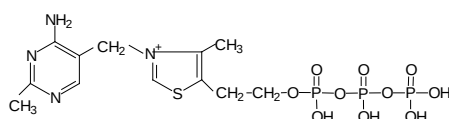
У більшості об'єктів живої природи вітамін В₁ присутній у вільній формі та у вигляді фосфорних ефірів. Нефосфорильований тіамін головним чином є транспортувальною формою вітаміну, тоді як біологічно активною формою є його фосфорильовані похідні, у вигляді яких він і реалізує свої біологічні функції в організмі. В клітинах різних тканин тварин і людини присутні тіамінмонофосфат (ТМФ), тіаміндифосфат (ТДФ) та тіамінтрифосфат (ТТФ).



тіамінмонофосфат



тіаміндифосфат



тіамінтрифосфат

аденільований тіамінтрифосфат

Нещодавно в біологічних об'єктах було ідентифіковано нове природне похідне тіаміну - аденільований тіамінтрифосфат - АТТФ. Розглянемо детальніше кожен з фосфорильованих форм.

ТМФ. В тканинах ссавців ТМФ утворюється при гідролізі ТДФ, в клітинах тварин не виявлено ніяких спеціалізованих шляхів або ензимів біосинтезу монофосфату. У мікроорганізмів та рослин, які здатні до синтезу вітаміну В₁ *de novo*, ТМФ синтезується під впливом ензиму тіамінфосфатсинтази (КФ 2.5.1.3) (Rodionov, Vitreschak, Mironov, & Gelfand, 2002).

В організмі людини фосфорилування катіонної форми тіаміну до нейтрального ТМФ є критичною передумовою для транспортування через мембрани, особливо у випадку проліферуючих нейронів (Bettendorff, Peeters, Wins, & Schoffeniels, 1993) та клітин крові. Монофосфорильована форма є біологічно неактивною і може розглядатися як транспортувальна форма тіаміну, розташованого за межами клітини, або як субстрат для утворення активних форм.

ТДФ. ТДФ - це перше похідне тіаміну, біологічну роль якого було детально досліджено. ТДФ є коензимом декількох ензимів вуглеводного обміну, порушення функції яких, як прийнято вважати, призводить до оксидативного стресу. Основні реакції, що каталізуються ТДФ-залежними ензимами, як і самі ензими, детально досліджені і описані. У тканинах ссавців до них відносяться, перш за все, реакції окислювального декарбоксилювання α -кетокислот, які каталізуються мультиензимними комплексами дегідрогеназ α -кетокислот: піруватдегідрогеназний комплекс (ПДК), α -оксокетоглутаратдегідрогеназний комплекс (ОГДК), аналогічні комплекси розгалужених α -кетокислот. ТДФ є коензимом першого ензиму цих комплексів, власне дегідрогенази, який каталізує реакцію окисного декарбоксилювання відповідної кетокислоти. У розщепленні і утворенні α -оксикислот і дикетонів також беруть участь ТДФ-залежні ензими, серед яких в тканинах ссавців найбільш значущим є транскетолаза (КФ 2.2.1.1). Синтез ТДФ в еукаріотичних організмах та принаймні у деяких прокаріот

(наприклад, *P.denitrificans*) відбувається шляхом одноетапного перенесення дифосфатної групи в ході реакції: тіамін + АТФ $\leftrightarrow$ ТДФ + АМФ, за участю АТФ:тіамінпірофосфотрансферази (тіамінпірофосфокінази, ТПК, КФ 2.7.6.2). ТДФ є найпоширенішою формою тіаміну в організмі (> 80%). Дослідження субклітинного розподілу тіамінфосфатів в мозку щурів виявили найбільш високий вміст ТДФ в мітохондріальній та синаптосомальній фракціях, найменший - в мікросомальній, мієліновій та цитозольній (Bettendorff et al., 1994).

ТТФ. У деяких випадках, залежно від локалізації та функції в клітині, ТДФ може бути перетворено тіамін-дифосфаткіназою (КФ 7.7.4.15) далі до тіамінтрифосфату (ТТФ) (Gangolf, Wins, Thiry, El Moualij, & Bettendorff, 2010). ТТФ охоплює 5-10% вмісту тіаміну в організмі (Bettendorff, Kolb, & Schoffeniels, 1993; Bettendorff, Peeters, et al., 1993; Gangolf et al., 2010; Nakagawasai, 2005) і відіграє роль у регуляції провідності мембран шляхом активації хлоридних каналів (Bettendorff, Kolb, et al., 1993) і також може функціонувати як донор фосфатних груп у реакціях фосфорилування в енергетичному обміні (Eder, Hirt, & Dunant, 1976; Nghiêm, Bettendorff, & Changeux, 2000). Також існує гіпотеза про участь ТТФ в адаптації до дії стресорних факторів. Було показано, що в клітинах *E.coli* спостерігається різкий підйом концентрації ТТФ в умовах енергодефіциту при анаеробному культивуванні, тоді як його практично неможливо детектувати при вирощуванні культури в присутності кисню. Аналогічна картина спостерігається в дослідженнях з використанням *Arabidopsis thaliana*: вміст ТТФ зростає при висушуванні та досягає максимуму через 2 години після вилучення рослини з ґрунту, що призводить до гіпоксії внаслідок порушення газообміну. Після повернення рослини до нормальних умов концентрація ТТФ знижувалась практично до нульового рівня (Lakaye, Wirtzfeld, Wins, Grisar, & Bettendorff, 2004).

Далі розглянемо особливості та шляхи метаболізму вітаміну в організмі в нормі та за наявності вроджених дефіцитів протеїнів обміну.

1.2.МЕТАБОЛІЗМ ТІАМІНУ В ОРГАНІЗМІ ССАВЦІВ ТА НА КЛІТИННОМУ РІВНІ

1.2.1. Засвоєння вітаміну організмом: всмоктування та перенесення з кров'ю.

Потрапляючи до організму тіамін проходить крізь шлунково-кишковий тракт, в ході котрого всі похідні дефосфорилуються. У тварин первинний пункт для прийому тіаміну в організмі знаходиться в стінках кишечника, де він всмоктується у вигляді катіону і переноситься в кров.

Тіамін зв'язується у тонкій кишці двома протеїнами- транспортерами, THTR1 і THTR2, продуктами генів SLC19A2 та SLC19A3 відповідно (Ganapathy, Smith, & Prasad, 2004; Rongbao Zhao & Goldman, 2013). Ці транспортери є тісно пов'язаними, мають 48% ідентичності, обидва виявляють підвищену афінність до тіаміну, залежні від рН та є насичуємим механізмом транспорту вітаміну через клітинні мембрани. Обидва протеїни широко розповсюджені в організмі, мають різні кінетичні властивості, вміст цих протеїнів змінюється в залежності від типу тканини. Вони диференційно розподіляються в поляризованих клітинах, наприклад у слизовій оболонці кишечника та ниркових каналців (Boulware, Subramanian, Said, & Marchant, 2003; Rindi & Laforenza, 2000). При дуже високих концентраціях вітаміну (більш ніж 2 мМ), тіамін поглинається клітинами за рахунок механізму простої дифузії. Хоча тіамін переважно абсорбується у вільній формі, існує також механізм абсорбції ТМФ за участю фолатного транспортеру (RFC1) (Rongbao Zhao, Gao, & Goldman, 2002). Це продукт гена SLC19A1, і він дуже тісно пов'язаний з двома вищезгаданими транспортерами тіаміну. Біологічне значення транспорту ТМФ в клітині остаточно не є зрозумілим, однак фактично цей механізм транспорту здатен забезпечити експорт тіаміну з клітин. Крім того, є також деякі докази прямого поглинання

ТДФ, виробленого кишковими бактеріями, в клітини кишківникового епітелію (Nabokina & Said, 2012). В епітелії кишківника на апікальній поверхні основним транспортером є THTR2, і саме він поставляє тіамін у клітину в обмін на іони гідрогену. На базальній поверхні за виділення вільного тіаміну у кровообіг головним чином відповідає THTR1. За потреби самої тканини, у клітинах слизової оболонки частина тіаміну може бути перетворена на ТДФ і ТМФ, решта експортуються в кровообіг за допомогою RFC1. (Brown, 2014)

В крові перенесення тіаміну реалізується еритроцитами (~ 75% вмісту тіаміну крові), плазмою (~ 10% вмісту тіаміну крові), лейкоцитами (~15%) та тромбоцитами (Casirola, Patrini, Ferrari, & Rindi, 1990). Активне та пасивне поглинання катіону тіаміну (T^+) в крові не залежить від температури, рН і концентрації натрію, і незначног ібується низкою інших субстратів (Lemos et al., 2012). Розподіл тіаміну в організм з кишечника у двох основних формах T^+ та ТМФ відбувається у людини протягом 1-2 години, (Tallaksen, Sande, Bøhmer, Bell, & Karlsen, 1993; Weber & Kewitz, 1985) з періодом напіврозпаду 96 і 300 хв відповідно.

1.2.2. Клітинні системи транспорту тіаміну . Характеристика сімейства транспортерів тіаміну.

Останні дослідження надають більш детальні відомості про шляхи транспортування тіаміну до цитозолу з позаклітинного простору. Було відкрито три різних сімейства специфічних до тіаміну транспортерів (Dutta et al., 1999; Said, Balamurugan, Subramanian, & Marchant, 2004). Перша група складається з сімейства тіамін-специфічних транспортерів (SLC19 протеїни, до яких, зокрема, відносяться вищевказані THTR1 і THTR2), які локалізовані в різних тканинах та найвищий рівень експресії мають у м'язах та серці (Dutta et al., 1999) і є селективними для різних форм тіаміну (ТМФ, ТДФ, і ТТФ) (Xu et al., 2013; R Zhao et al., 2001; Rongbao Zhao et al., 2002). Друге сімейство транспортерів складається зі специфічних членів екстранейрональних моноамінових

транспортних протеїнів людини (hEMT), що транспортують амінні форми поживних речовин і нейротрансмітерів, включаючи тіамін, до нейронів (Calhaу, Martel, Hipólito-Reis, & Azevedo, 2003). Третю групу складають протеїни транспортної системи лужної фосфатази (ALP), які є металлоензимами з афінністю до різних молекулярних сигнальних факторів, таких як нейромедіатори та іонні метаболіти (Oshima, 1997). В кінцевому підсумку, комбінація транспортерів органічних катіонів, транспортної системи лужної фосфатази, пірофосфокінази та розчинних протеїнів-носіїв забезпечують транспорт тіаміну до цитозолу.

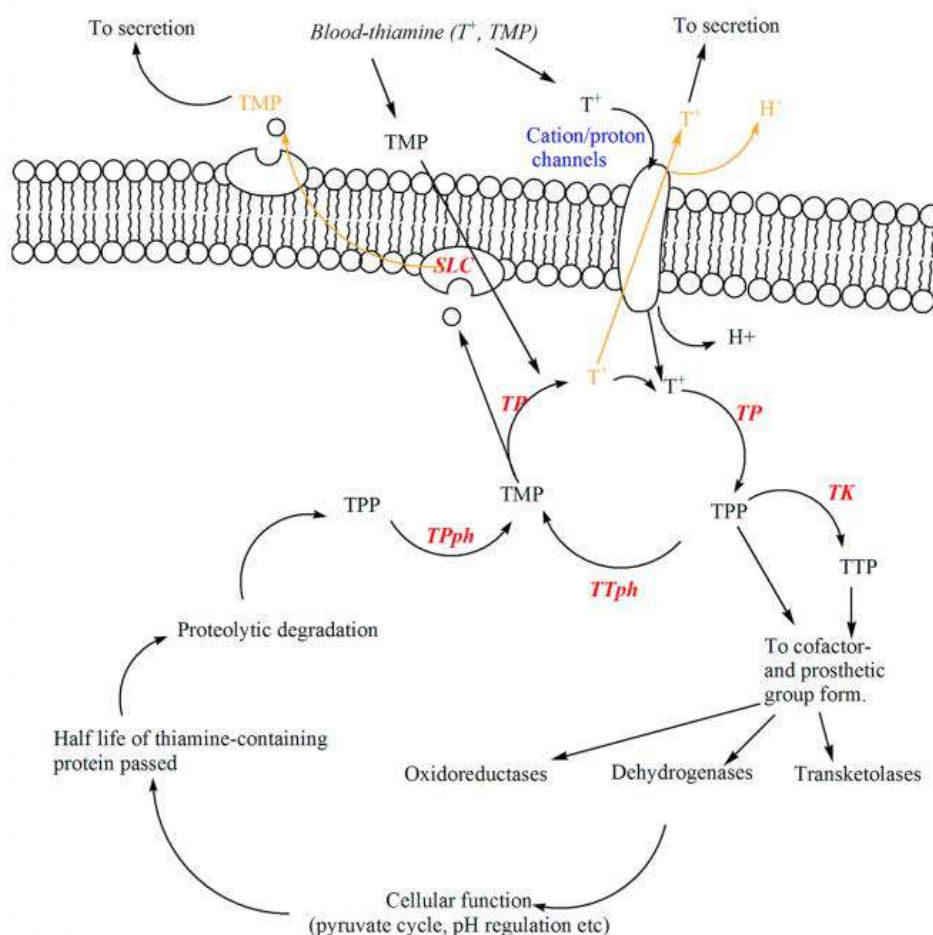


Рис 1.1. Транспортні системи та метаболізм тіаміну у клітині (Manzetti 2014)

1.2.3. Перетворення тіаміну на біологічно активні форми. Характеристика тіамінпірофосфокінази.

Після потрапляння до клітини вільний тіамін миттєво перетворюється на коензимну форму – ТДФ, за допомогою ензиму тіамінпірофосфокінази (ТПК). Незважаючи на деякі індивідуальні особливості, ТПК, виділені з різних об'єктів, виявляють спільні властивості: це гомодимери з молекулярною масою 50-64 кДа, активуються іонами двохвалентних металів: Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , меншою мірою Cd^{+} , Ni^{+} , Rb^{+} , Zn^{2+} і Fe^{2+} , при цьому істинним субстратом є комплекс іону металу з нуклеозидтрифосфатом (Onozuka & Nosaka, 2003). ТПК характеризується широким діапазоном специфічності по відношенню до обох субстратів, K_m для тіаміну складає 0,1 – 10 мкМ, а K_m для АТР – 0,38-5,9 мМ 60, 61, 63, 65. Ензим локалізований у цитоплазмі, інгібується сульфгідрильними отрутами, нуклеотидмонофосфатами та аналогами тіаміну (Mitsuda, Takii, Iwami, & Yasumoto, 1975; Sanemori & Kawasaki, 1980; Воскобоев, 1987). Методом сайт-спрямованого мутагенезу було показано, що в каталітичному механізмі рекомбінантної ТПК людини важливу роль відіграють залишки Asp-71, Asp-73, Gln-96, Thr-99, Asp-100, Asp-131, Asp-133 62. Формування ТДФ відбувається в цитоплазмі клітини, і кофактор відразу ж стає доступним для асоціації з транскетолазою. Для забезпечення активного кофактора для α -кетокислотдегідрогеназ, які розташовані в мітохондріальній матриці, у внутрішній мітохондріальній мембрані є ТДФ-транспортер (МТРРТ, продукт гена SLC25A19) (Kang & Samuels, 2008). Також нещодавно було показано, що процес поглинання мітохондріального тіамінпірофосфату (МТРР) адаптовано регулюється рівнем тіаміну і ця регуляція опосередкована, принаймні частково, транскрипційним та епігенетичним механізмами, що впливають на промотор SLC25A19 (Sabui, Subramanian, Kapadia, & Said, 2017). Екскреція тіаміну з клітин відбувається за допомогою тих самих транспортних систем, що і потрапляння (Brown, 2014; Manzetti et al., 2014). Приблизно 53% тіаміну, що потрапляє в організм з їжею, в кінцевому підсумку виділяється з сечею (Losa, Sierra, Fernández, Blanco, & Buesa, 2005), в той час як 47% протягом 6-12 годин

розподіляється з крові до тканин і органів (Casirola et al., 1990; Tallaksen et al., 1993).

1.3. ГЕНЕТИЧНІ ПОРУШЕННЯ ОБМІНУ ТІАМІНУ.

На сьогоднішній день виявлено кілька вроджених патологій, пов'язаних з мутаціями у генах протеїнів, що беруть участь у метаболізмі тіаміну. Розглянемо коротко мутації по кожному з цих генів.

1.3.1. Дефіцит транспортеру тіаміну THTR1

Дефіцит THTR1 приводить до тиамін-чутливої мегалобластичної анемії, відомої також як синдром Роджерса (Neufeld, Fleming, Tartaglini, & Steinkamp, n.d.; Ricketts et al., 2006)(OMIM 249270). Цей стан характеризується основною тріадою ознак: окрім мегалобластичної анемії у хворих виявляється цукровий діабет та сенсіуральна глухота. Захворювання, як правило, діагностується у дитинстві, і зазвичай анемія є першою визнаною ознакою та часто супроводжується тромбоцитопенією (Bazarbachi et al., 1998). Крім основних ознак, цьому стану притаманні й інші прояви, включаючи серцеві аномалії, порушення зорових зображень, аномалії сітківки та інсультподібні стани. У кількох пацієнтів з аритміями та кардіоміопатією виявлено різні мутації гена SLC19A2, що зумовлюють дефіцит транспортера THTR1 (Lorber, Gazit, Khoury, Schwartz, & Mandel, n.d.). Однак, оскільки основна увага, у більшості випадків, приділялася дослідженню гематологічних аспектів, біохімічні наслідки були досить слабо визначені. Додаткові клінічні ознаки свідчать про значну ідентичність з проявами мітохондріальних захворювань, що зумовлюється важливістю мультиензимних комплексів дегідрогеназ α -кетокислот в енергетичному обміні. У пацієнтів з дефіцитом THTR1 виявлено підвищення концентрації лактату в крові та цереброспінальній рідині, спостерігається зниження активності комплексу I дихального ланцюга та піруватдегідрогенази, однак з введенням тіаміну показники нормалізуються (Scharfe et al., 2000). Було

проведено кілька досліджень можливих патогенних механізмів, відповідальних за мегалобластичну анемію при дефіциті THTR1. Роль дисбалансу в біосинтезі ДНК та РНК в еритропоезі призвела до розгляду активності циклу пентозофосфату в цілому та, зокрема, ензиму транскетолази при наданні рибозо-5-фосфату для цих процесів. Як відомо, рибозо-5-фосфат може утворюватись з глюкози або через рибулозо-5-фосфат, продукт окислювального відгалуження шляху, або від гліколітичних проміжних сполук через серію перетворень вуглеводів. Ці перетворення залежать від активності транскетолази. В лабораторних дослідженнях синтез рибози з глюкози проводили у культивованих фібробластах у хворих з дефіцитом THTR1 (Boros et al., 2003). Виявилось, що синтез РНК значно знижується в збідненому тіаміном середовищі. Біохімічні аномалії нівелюються, коли клітини вирощують у середовищі, що доповнюється тіаміном. Різні прояви синдрому в більшій чи меншій мірі реагують на коригування тіаміном. Анемія, серцеві аритмії та цукровий діабет, як прояви дефіциту THTR1, дуже добре піддаються лікуванню дозами тіаміну в межах 25-50 мг на добу (хоча деякі пацієнти лікувалися значно більшими дозами) (Borgna-Pignatti, Azzalli, & Pedretti, 2009; Ricketts et al., 2006), що свідчить про тіамін-чутливість патологічного стану.

1.3.2. Дефіцит транспортеру тіамну THTR2

Генетичний дефект у SLC19A3, гена THTR2, був ідентифікований у групи хворих, в яких спостерігається мутація p.thr422ala (Zeng et al., 2005). Останнім часом з'явилися два повідомлення про мутації SLC19A3 у пацієнтів з восьми не пов'язаних сімей з летальною енцефалопатією та симетричними ураженнями в таламусі, базальних гангліях і стовбурі мозку (Gerards et al., 2013; Kevelam et al., 2013). У деяких з цих пацієнтів були задокументовані різні біохімічні аномалії, включаючи підвищену концентрацію лактату в крові та цереброспінальній рідині, а також знижену активність дегідрогеназ пірувату та α -кетоглутарату у м'язах. Патологічний стан характеризувався високою чутливістю до тіаміну, що було досить очікувано. Цікавим аспектом цього стану є відповідь на введення

біотину, оскільки THTR2 не транспортує біотин (Subramanian, Marchant, & Said, 2006). Пояснення біотин - чутливості може зумовлюватись важливістю ролі біотину в експресії генів. Крім того, що біотин є кофактором, він також бере участь у експресії ряду генів, у тому числі для ензимів, задіяних у метаболізмі глюкози (Dakshinamurti, 2005; Rodriguez-Melendez & Zempleni, 2003). Механізм регуляції експресії генів включає в себе, зокрема, активацію сигнальних шляхів cGMP за допомогою біотиніл-АМФ та біотинілювання гістонів H3 та H4 голокарбоксилазсинтази (Rodriguez-Melendez & Zempleni, 2003). У дослідженні геному людей з дефіцитом біотину було продемонстровано суттєве зниження експресії гена SLC19A3 (Vlasova, Stratton, Wells, Mock, & Mock, 2005). У хворих з дефіцитом THTR2 через мутації в цьому гені знижений вміст біотину може підсилювати негативні прояви, котрі можуть бути подолані споживанням біотиновмісних харчових добавок.

1.3.3. Дефіцит мітохондріального транспортера ТДФ

Мітохондріальний транспортер ТДФ є продуктом гену SLC25A19 і спочатку описувався як мітохондріальний носій дезоксинуклеотидів (Dolce, Fiermonte, Runswick, Palmieri, & Walker, 2001; Kang & Samuels, 2008). Дефіцит цього носія вперше було виявлено у випадку летальної мікроцефалії Аміш (OMIM 607196), це стан з характерним зовнішнім проявом та збільшенням екскреції α -кетоглутарату в сечі, виявляється за допомогою МРТ головного мозку. Всі пацієнти з амішської спільноти мають загальну мутацію p.Gly177Ala (Rosenberg et al., 2002). Хоча це захворювання, як правило, є хворобою з ранньою смертністю, існує повідомлення про пацієнта який пережив пізнє дитинство (Siu, Ratko, Prasad, Prasad, & Rupar, 2010).

Подальша ідентифікація мутацій гену SLC25A19 у пацієнтів свідчить, що спектр цього стану, ймовірно, буде набагато ширшим. Чотири випадки було описано з наявністю загострення пухкого паралічу та енцефалопатії, (Spiegel et al., 2009). Під час загострення розвинулись моторна та сенсорна нейропатії, котрі

супроводжувались підвищеною концентрацією лактату у крові. Екскреція α -кетоглутарату не збільшувалася, і у однієї пацієнтки активність комплексів дихальних ланцюгів та піруватдегідрогенази у м'язах була у межах норми (Brown, 2014).

1.3.4. Дефіцит ТПК

Дефіцит ТПК було задокументовано у п'яти пацієнтів з трьох сімей (Maug et al., 2011)(ОМІМ 606370). Усі випадки мали загальні риси: епізодична атаксія, психомоторна відсталість і дистонія. Зміни на МРТ головного мозку були досить різноманітними з глобальною атрофією та ненормальним сигналом у базальних гангліях, мозочку та стовбурі мозку. Двоє пацієнтів померло в дитинстві. Інші у якості підтримуючої терапії отримували тіамін у кількості 100-200 мг на добу та харчувалися дієтою з високим вмістом жиру (Huang et al., 2018). Проводилось біохімічне дослідження, яке показало постійне підвищення рівня концентрації лактату в крові та цереброспінальній рідині при епізодах атаксії та підвищеній екскреції α -кетоглутарату в сечі. Концентрація ТДФ як у крові, так і в м'язах була суттєво зниженою у порівнянні з нормою. Хоча генетичний дефект теоретично повинен впливати на всі ТДФ-залежні ензими, при дослідженні піруватдегідрогеназної активності у м'язах виявилось, що активність знаходиться у межах норми (Banka et al., 2014).

Узагальнюючи вищенаведене, можна сказати, що мутаційні зміни у генах протеїнів метаболізму тіаміну призводять не тільки до порушень вуглеводного обміну, але й до розвитку низки серцево-судинних та нейродегенеративних патологій. Кожна з наведених патологій має різну ступінь відповіді на терапію високими дозами тіаміну, але спостерігається загальна тенденція до поліпшення стану та зменшення прояву патологічних симптомів.

1.4. ТІАМІН-ДЕФІЦІТНІ СТАНИ

1.4.1. Прояви нестачі тіаміну

Дослідження проявів дефіциту тіаміну (ТД) почалися з першої половини ХХ сторіччя, коли в країнах Азії панувала пандемія бері-бері. Бері-бері супроводжується порушенням функції периферичної нервової системи, а також характерними ураженнями серцево-судинної системи. Ця хвороба розвивається у людей з обмеженим харчуванням, недостатнім на вітамін В₁ (перші спостереження – харчування виключно полірованим рисом)(Saini, Lin, Kang, & Umapathi, 2018), і успішно піддається тіаміновій терапії. Накопичені на сьогодні дані літератури переконливо свідчать про те, що багато відомих нейродегенеративних патологій, зокрема таких, як бері-бері, синдром Верніке-Корсакова, некротизуюча енцефаломієлопатія (хвороба Лея), хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона (PD), хвороба «сечі кленового сиропу», тіамінзалежна анемія, метаболічні хвороби, викликані дефіцитом регуляторних або основних протеїнів ПДК, і деякі інші, супроводжуються в тій чи іншій мірі вираженням ТД (Bettendorff, 1996; Bisswanger, 1974; Itokawa, 1996; Nghiêm et al., 2000). При цьому не можна виключити того, що для розвитку більшості згаданих патологій ТД та/ або порушення його обміну можуть виявитися ініціюючим фактором. Саме тому дослідники все частіше використовують експериментальні моделі ТД для вивчення механізмів розвитку нейродегенеративних процесів (Reed, 1981).

1.4.2. Аліментарний авітаміноз тіаміну

Для розвитку експериментального аліментарного авітамінозу використовується спеціальна дієта, котра містить усі необхідні для раціону компоненти, окрім тіаміну. Через чотири тижні утримання тварин на безтіаміновій дієті спостерігаються симптоми порушень у функціонуванні нервової системи (судоми, паралічі), апатія та відмова від їжі, також щуридесь наприкінці другого

тижня припиняють набирати вагу, а наприкінці четвертого тижня втрата ваги становить майже 50% від початкової. Відомим є той факт, що за умов ТД спостерігається розвиток оксидативного стресу, що було підтверджено, зокрема, зростанням концентрації продуктів глікування у плазмі та тканинах (Shangari, Mehta, & O'brien, 2007). Було продемонстровано, що дефіцит тіаміну під час вагітності призводить до збільшення маркерів окислювального стресу і загострення нейроапоптозу у мозку плоду та порушення функції нейронів (Fernandes et al., 2017; Kloss, Eskin, & Suh, 2018). У експерименті на мишах з аліментарним ТД відбувалося підвищення кількості маркерів оксидативного стресу, а також виявилось що аліментарний ТД і оксидативний стрес синергічно збільшують концентрацію кінцевих продуктів глікування (Shangari, Depeint, Furrer, Bruce, & O'Brien, 2005). Однак прийти до однозначного висновку, що саме є первинним в ураженні функції нервової системи - порушення функцій ТДФ-залежних ензимів, окислювальний стрес, який супроводжує цей процес, або порушення інших, ще невідомих, тіамінзалежних процесів, виявляється досить проблематичним.

1.4.3. Аліментарний гіповітаміноз тіаміну

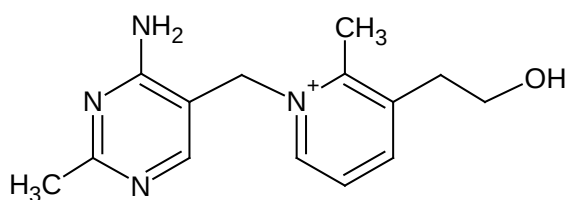
Оскільки голодування більш не є поширеною проблемою у сучасному цивілізованому світі і завдяки популяризації відомостей щодо ролі вітамінів у здоров'ї людини, випадки глибокого аліментарного В₁-авітамінозу, що призводять до розвитку хвороби бері-бері, є досить рідкими (Gaüzère & Aubry, n.d.). Але у XX-XXI сторіччях все частіше серед населення діагностується аліментарний гіповітаміноз, який розвивається за умов хронічної нестачі вітаміну в харчуванні. Причиною цьому є дія на організм людини різноманітних несприятливих чинників, екзогенного та ендогенного походження, таких як забруднення навколишнього середовища, стреси, вживання алкоголю, харчування збідненими за вмістом вітаміну продуктами та інше (Zita Weise Prinzo, 1999). У результаті симптоми дефіциту тіаміну є менш виявленими та стан проявляється у підвищеній втомлюваності, головних болях, послабленні

пам'яті, безсонні і т.д. Зміни в обміні тіаміну при хронічному В₁-гіповітамінозі, також як і їх роль у розвитку нейродегенеративних процесів є малодослідженими.

1.4.4. Синтетичні похідні тіаміну, що використовуються як його антагоністи

Поширеною практикою для дослідження наслідків ТД є використання антагоністів тіаміну, найвідомішими з котрих є піритіамін, окситіамін та ампроліум (Singleton & Martin, 2001), дія яких на обмін тіаміну на сьогодні є досить добре дослідженою (Rindi, Patrini, Nauti, Bellazzi, & Magni, 2003).

Найбільш ефективним антагоністом тіаміну по дії *in vivo* є піритіамін, в його молекулі тiazолове кільце, яке є в молекулі тіаміну, замінене піридиновим.

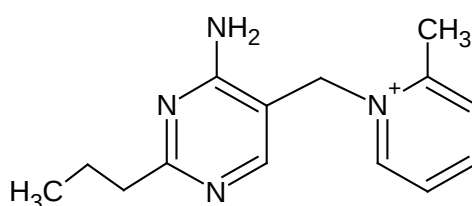


піритіамін

Піритіамін повністю відтворює неврологічні порушення, які спостерігаються при паралітичній формі захворювання бері-бері та синдромі Верніке-Корсакова (R F Butterworth & Héroux, 1989). Цей антагоніст інгібує транспорт тіаміну так само як і ампроліум, а також є експериментальні дані, що він взаємодіє з тіамінпірофосфокіназою та перешкоджає синтезу ТДФ (Lumeng, Edmondson, Schenker, & Li, 1979). Епізодичні дані свідчать, що піритіамін здатен фосфорилуватися, утворюючи піри-ТДФ (J.-Y. Liu, Timm, & Hurley, 2006a), антикоензим. Але навіть якщо це і так, залишається проблематичним питання, чи може утворений піри-ТДФ взаємодіяти далі з апоензимами ТДФ-залежних ензимів. На нашу думку, висока нейротоксичність піритіаміну обумовлена тим,

що ця сполука, специфічно блокуючи фосфорилювання тіаміну в клітині, гальмує функціонування рухомого пулу вільних похідних тіаміну в нервових клітинах, що і веде клітину до загибелі. Це і може бути причиною неврологічних порушень подібних до таких при синдромі Верніке-Корсакова, які викликає піритіамін (J.-Y. Liu et al., 2006a).

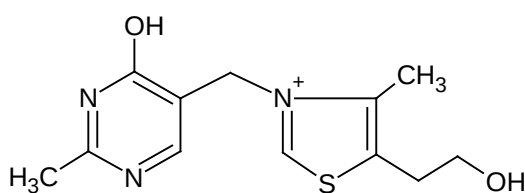
Ампроліум - 1-[(4-аміно-2-пропіл-5-піримідиніл) метил]-2-піколініум хлорид – ще одне штучно синтезоване похідне тіаміну.



ампроліум

Він є ефективним інгібітором транспорту тіаміну через плазматичні мембрани, але не впливає на утворення ТДФ (Lumeng et al., 1979). Клітини під впливом ампроліуму здатні утримувати низькі концентрації тіаміну та піддаватися смерті повільніше, ніж клітини, оброблені такими антагоністами як піритіамін чи окситіамін. Ампроліум широко використовується для лікування та профілактики кокцидозу у тварин. Він блокує вхід тіаміну в клітини паразитів набагато ефективніше, ніж в клітини епітелію кишечника тварини-хазяїна (Agyei-Owusu & Leeper, 2009; Rogers, 1982)..

Ще одним антагоністом тіаміну є окситіамін, в молекулі якого відповідно до молекули тіаміну аміногрупа в четвертому положенні заміщена гідроксильною групою.



окситіамін

Тобто, окситіамін – найбільш близький за структурою до тіаміну його антагоніст. Незважаючи на це, окситіамін має набагато нижчу афінність до протеїнів, що беруть участь в обміні тіаміну, ніж сам тіамін. Ця сполука здатна проникати через плазматичну мембрану та фосфорилюватися ТПК до окси-ТДФ, який, заміщаючи ТДФ у ТДФ-залежних ензимах, не здатен виконувати функцію останнього за рахунок того, що каталітично важлива аміногрупа у молекулі заміщена на гідроксильну. Окситіамін спричинює такі фізіологічні відхилення як летаргія та анорексія, тоді як піритіамін в основному – неврологічні відхилення (Ali, 1985; J.-Y. Liu et al., 2006a). Це можна пояснити також і тим фактом, що на відміну від піритіаміну, проходження окситіаміну через гемато-енцефалічний бар'єр є проблематичним (Haas, 1988). Специфіка механізмів дії антагоністів тіаміну на його метаболізм дає непогану можливість використовувати подібні відмінності для інтерпретації отриманих результатів з метою оцінити коензимні та некоензимні аспекти дії цього вітаміну в нервових клітинах.

1.4.5. Хронічний алкоголізм як ефективна модель дефіциту тіаміну

Аналіз змін метаболізму тіаміну при аліментарному B_1 -авітамінозі і хронічному алкоголізмі, проведений багатьма дослідниками до теперішнього часу, дозволяє зробити висновок, що хронічний алкоголізм також можна розглядати як досить ефективну адекватну модель B_1 -авітамінозу (Bâ, 2011; Qin & Crews, 2014).

РОЛЬ ТІАМІНУ У НЕРВОВІЙ СИСТЕМІ

1.4.6. Основні гіпотези щодо нейротропної функції тіаміну

Надзвичайно високу чутливість нервових клітин до дефіциту вітаміну B₁, яка значно перевищує чутливість клітин інших тканин, виявилось неможливим пояснити лише з позиції участі ТДФ як коензиму в функціонуванні ряду ключових ензимів вуглеводного обміну. Ця обставина стала причиною зародження гіпотези про існування специфічної "нейротропної" функції вітаміну B₁. Тривалий час дослідження цієї функції відбувалося у межах двох гіпотез: мембранної та метаболічної.

1.4.6.1. Мембранна гіпотеза

Головна ідея мембранної гіпотези передбачає безпосередню участь тіаміну та / або його біологічно активних похідних в процесі генерації нервового імпульсу на рівні збудливих мембран. Розвиток цього напрямку бере початок від досліджень Бінет і Мінца (Binet & Minz, 1936). Як продемонстрували автори, при електричній стимуляції препаратів блукаючого нерву і нервово-м'язових препаратів в інкубаційне середовище вивільняється сполука, яку в 1938 р Мінц ідентифікував як тіамін. Далі кілька груп вчених виявили, що тіамін впливає на генерацію і проведення потенціалів дії в нервових препаратах (KUNZ, 1956; PETROPULOS, 1960; Sasa, Takemoto, Nishino, & Itokawa, 1976). Все ж слід відзначити, що мембранна гіпотеза, яка передбачає специфічну участь вітаміну B₁ виключно у функціонуванні структур збудливих мембран, не отримала подальшого розвитку. Проте ряд результатів, отриманих в «мембранних» дослідженнях, стали базою для подальшого вивчення молекулярних механізмів участі вітаміну B₁ у функціонуванні нервових клітин.

1.4.6.2. Метаболічна гіпотеза

Відповідно до метаболічної гіпотези, в нервових клітинах, крім пулу ТДФ, що є зв'язаним ензимними протеїнами, існує пул похідних тіаміну, що

характеризується високою швидкістю обміну і циркуляція якого між пресинаптичною щілиною і внутрішньоклітинним простором спряжена із функціонуванням збудливих мембран і обміном ацетилхоліну (АХ). Такі уявлення були підтримані низкою фактів, описаних в різний час. Наявність швидкообмінного пулу похідних тіаміну було постульовано декількома дослідниками, незалежно один від одного (Berman & Fishman, 1975; Bettendorff, Kolb, et al., 1993; I. M. Parkhomenko, Donchenko, & Protasova, n.d.). Наявність в нервових клітинах лабільного пулу тіаміну, на наш погляд, підтверджують також дані, отримані групою японських дослідників (Tanaka, Itokawa, & Tanaka, 1973). Вивчаючи локалізацію тіаміну в препаратах сідничного нерву, перев'язаного та неперев'язаного, вони виявили в місці лігатури акумуляцію тіаміну, зумовлену переміщенням його похідних з аксоплазми до периферії клітини. Уявлення про наявність в клітині мобільного пулу тіаміну і його фосфатів, функціонально пов'язаного зі змінами мембранного потенціалу нервової клітини, узгоджуються з сучасними уявленнями про високу динамічність клітинних структур як невід'ємну властивість живої клітини.

1.4.7. Значення тіаміну у функціонуванні нервової системи

Для розуміння значення тіаміну у функціонуванні нервової системи, спочатку розглянемо роль та функції вітаміну у функціонуванні нервової тканини за умов норми та спробуємо відзначити особливості і відмінності цих процесів від метаболізму тіаміну інших тканин.

Тіамінзалежні процеси контролюють ключові ланки метаболізму глюкози в мозку, що є критичним для нормального його функціонування. Тіамін задіяний у багатьох ензимативних процесах, пов'язаних з розвитком мозку, його функціонуванням, підтримкою міжнейрональних комунікацій (R F Butterworth & Besnard, 1990; Gibson & Blass, 2007). Роль тіаміну у цих контекстах полягає, зокрема, в участі у процесі генерації ацетилхоліну (Perri, Sacchi, & Casella, 1970). Тіамін знаходиться в катіонній формі (T^+) при фізіологічному рівні рН і має

вплив на потенціал нервової дії через провідність мембран та передачу сигналу нейронів (Cooper & Pincus, 1979; Eder et al., 1976; Nghiêm et al., 2000; Tallaksen & Taubøll, 2000), стимулюючи функцію та активність мозочка та спинного мозку (Bâ, 2008; Patrick J Mulholland, 2006). T^+ також бере участь у проведенні нервових сигналів через синапси, і припускається що тіамін може використовуватись в якості молекули - човника через біологічні мембрани, враховуючи його позитивний заряд (Cooper & Pincus, 1979). Тіамін бере участь у відновленні нервової тканини та модуляції нервових сигналів, оскільки знижує гіперзбудливість та частково відновлює токи катіонів натрію в пошкоджених нейронах, а також завдяки своїй нещодавно дослідженої ролі в зниженні термічної гіпералгезії (Song, Huang, & Song, 2009; Z.-B. Wang, Gan, Rupert, Zeng, & Song, 2005). Аналіз чисельних досліджень особливостей обміну тіаміну в тканині мозку дає підстави вважати, що висока чутливість нервової системи до надходження тіаміну в організм, ймовірно, зумовлена особливістю структурно-функціональної організації нервових клітин а не наявністю в них якихось специфічних тіамін залежних біохімічних реакцій.

1.4.7.1. Тіамін та астроглія

Як відомо, нервова тканина складається з двох типів клітин: власне нейронів, що проводять імпульс та глії, що оточує нейрони. Виділяють мікро- та макроглію, остання має кілька типів клітин, кожен з котрих має свою функцію та маркери функціонального стану. Так як останнім часом з'являється все більше повідомлень щодо особливої чутливості астроцитів (клітин макроглії) до умов ТД (Afadlal, Labetoulle, & Hazell, 2014; Alan S Hazell, n.d.; Alan S Hazell, Pannunzio, Rama Rao, Pow, & Rambaldi, 2003), розглянемо їх структуру та функції детальніше. Загальновідомо, що астроцити - великі зіркоподібні клітини, поширені по всьому мозку, які допомагають підтримувати належний склад рідини, що оточує нейрони. Наприклад, астроцити виконують захват нейротрансмітерів, що вивільняються нейронами, і мінералів, таких як калій, які виділяються під час енергетичного обміну мозку. Крім того, астроцити усувають

деякі речовини, які є токсичними для нейронів. Правильне функціонування астроцитів та їх взаємодія з нейронами є важливими для функціонування мозку (Roger F Butterworth, 2003a). Метаболічні розлади у взаємодії між нейронами та астроцитами можуть викликати нейродегенеративні порушення та ряд інших патологій, тому нормальна робота та обмін речовин нейронів у мозку залежать від активності астроцитів. Астроцити з патологічно модифікованою функцією можуть вивільняти нейротоксичні фактори, втрачають здатність до міжклітинної взаємодії та посилюють прогресування патологій (Pekny et al., 2016). Також відомо, що дисфункція астроцитів за B_1 - дефіцитних станів відіграє провідну роль у патофізіологічних процесах, що супроводжують розвиток авітамінозу (Karuppagounder et al., 2009).

1.4.7.2. Тіамін та нейрони

Наразі підтверджено, що тіамін, та нормальне функціонування його транспортних систем є критичним для метаболізму нейронів. Наприклад нокаутування генів кожного з ключових протеїнів метаболізму тіаміну, а саме Trk1, Slc25a19 і Slc19a3, на культурі нейронів гіпокампу призводило до порушення розростання дендритів та зменшення розміру тіла нейронів. Ці зміни, в свою чергу, сприяють зменшенню розміру мозку та розвитку нейродегенерації. (H. Liu et al., 2017). Іншою групою науковців було продемонстровано, що тіамін і його похідне бенфотіамін запобігають стресовому інгібуванню нейрогенезу гіпокампа та супутнім фізіологічним змінам. Це дозволяє припустити, що похідні тіаміну з високою біодоступністю можуть бути корисними як комплементарна терапія в ряді нейропсихіатричних розладів (Vignisse et al., 2017).

1.5. Нейродегенеративні захворювання, що супроводжуються дефіцитом тіаміну

Як можемо бачити із вищенаведеного, тіамін є критично важливим для нормального функціонування нервової тканини. Більш того, за останній час накопичуються дані щодо наявності дефіциту тіаміну різного ступеню при

розвитку майже усіх відомих нейродегенеративних захворюваннях. Але досі є незрозумілим, чи розвиток дефіциту стає поштовхом для розвитку нейродегенерації, чи навпаки. Задля дослідження цього аспекту вчені стали використовувати тваринні та клітинні моделі нестачі тіаміну для вивчення розвитку нейродегенерації. Далі розглянемо розповсюджені захворювання нервової системи, що супроводжуються дефіцитом тіаміну.

1.5.1. Хвороба Альцгеймера

Хвороба Альцгеймера (АД) - це найпоширеніший тип деменції у дорослих та є серйозною глобальною загрозою на тлі все більш прискореного процесу старіння суспільства (Alzheimer's Association, 2013). Точна етіологія та патогенез АД залишаються незрозумілими. Дослідження показали, що гіпометаболізм глюкози є інваріантною ознакою за АД (Z. Chen & Zhong, 2013), і це відбувається до появи симптомів захворювання і може тривати навіть протягом десятиліть до прояви перших ознак АД (Bateman et al., 2012; Mosconi et al., 2006). Крім того, ступінь та топографія пригнічення метаболізму глюкози у хворих на АД корелює з розвитком когнітивних порушень (Mosconi, 2005; Mosconi, Puri, & De Leon, 2008). Оскільки ТДФ є ключовим коензимом трьох критичних ензимів метаболізму глюкози, його рівень досліджувався за умов розвитку АД. Було продемонстровано, що рівень ТДФ (Bettendorff, Mastrogiamaco, Kish, & Grisar, 1996; M. Gold, Hauser, & Chen, 1998; Pan et al., 2016; Rao et al., 1993) та активність ензимів, що залежать від ТДФ (Gibson, Karuppagounder, & Shi, 2008; Mimori, Katsuoka, & Nakamura, 1996; Sheu et al., 1988), значно зменшуються. Попередні дослідження також продемонстрували, що дефіцит тіаміну може викликати або загострювати АД-подібні патології: за умов ТД утворення бляшек та процес гіперфосфорилювання тау-протеїнів прискорюється, загострюється дефіцит пам'яті (Gibson et al., 2016). Цікавим є той факт, що введення бенфотіаміну, ліпідирозчинної похідної тіаміну, зменшує прояв АД-подібних патологій та покращує когнітивну функцію на тваринній моделі АД (Pan et al., 2010). Проте введення самого тіаміну додатково не призводить до значних

поліпшень при клінічних дослідженнях хвороби Альцгеймера (Meador et al., n.d.; Mimori et al., 1996; Nolan, Black, Sheu, Langberg, & Blass, 1991). Показано, що активності ТДФази та ТМФази значно збільшені у хворих на АД порівняно з показником у контрольних пацієнтів, проте активність ТПК у крові хворих на АД не суттєво відрізняється від контрольної групи (Roger F Butterworth, 2003b).

Іншим аспектом, що пов'язує ТД з хворобою, є віковий фактор. Як відомо, старіння - це ключовий фактор ризику для АД. Крім того, дослідження показали, що люди похилого віку мають більш високий ризик розвитку ТД. Трирічний огляд показав, що зниження концентрації ТДФ у літніх людей пов'язане більше з віком, ніж із супутніми хворобами (Wilkinson & Hanger, n.d.). Рівень ТДФ у тканині мозку значно знижується (на 18-21%) в групі АД у порівнянні з контрольною групою, тоді як рівень вільного тіаміну та ТМР залишається у межах норми у всіх досліджуваних ділянках (Mastrogiacoma, Bettendorff, Grisar, & Kish, 1996). Gold (G. Gold et al., 2005) у своїх дослідженнях продемонструвала специфічність змін метаболізму тіаміну для АД: рівень тіаміну суттєво знижувався у плазмі крові за АД, але не при хворобі Паркінсона (PD), іншому нейродегенеративному розладі, що характеризується аномалією руху. Легко припустити, що зниження активності тіамінзалежних ензимів призводить до гіпометаболізму глюкози в когнітивно нормальних людей, а також у когнітивно порушених пацієнтів. Судячи з усього, ТДФ-залежні процеси мають вирішальне значення для метаболізму глюкози, який, як доведено, порушується за розвитку АД. Крім того, низький рівень глюкози в організмі також викликає окислювальний стрес і підвищує структурні та функціональні порушення нейронів, включаючи перекісне окислювання ліпідів, апоптоз тощо. Дослідження показують, що дисбаланс між фосфорилуванням та дефосфорилуванням в обміні тіаміну може сприяти гіпометаболізму глюкози в мозку за АД, отже нівелювання цього дисбалансу може бути потенційною мішенню для профілактики та лікування АД. (Gibson & Blass, 2007).

1.5.2. Синдром Верніке-Корсакова

Дефіцит тіаміну є поширеним при хронічному алкоголізмі та може спричинити синдром Верніке-Корсакова, нейропсихіатричний стан, що характеризується офтальмоплегією, атаксією та втратою пам'яті (C. Harper, n.d.; C. G. Harper, Giles, & Finlay-Jones, 1986; Hear et al., 2002; Leevy, 1982; Thomson, n.d.). Хоча хронічний алкоголізм закінчується розвитком цієї патології не завжди, ознаки ТД незмінно виявляються при хронічному споживанні алкоголю людиною (або тваринами в експериментальних моделях) (Bueno et al., 2015; Frijlink, Tilanus, & Roks, 2012; Hear et al., 2002; Yu. M. Parkhomenko et al., 2014; Yulia M Parkhomenko et al., 2011). Виділені у пацієнтів з синдромом Верніке-Корсакова тканини мозку, характеризувалися глиозом, судинними ушкодженнями і втратою нейронів в конкретних регіонах, таких як сосковидні тіла, нижня олива і таламус (C. G. Harper et al., 1986; Pannunzio, Hazell, Pannunzio, Rao, & Butterworth, 2000; Troncoso, Johnston, Hess, Griffin, & Price, 1981). Синдром Верніке-Корсакова призводить до структурних ушкоджень ключових перивентрикулярних структур головного мозку (Bueno et al., 2015; Frijlink et al., 2012). Отримано численні вказівки на те, що ці осередкові гістологічні деструкції є ознаками гліопатії, в основному пов'язаної зі змінами в астроцитах. Такі зміни включають в себе зменшення кількості глутаматних транспортерів GLT-1 і GLAST (що супроводжується підвищенням внутрішньоклітинних концентрацій глутамату), зниженням рН в тканині мозку, що асоціюється з підвищенням утворення лактату, зменшенням вмісту гліального кислого протеїну філаментів (GFAP, glial fibrillary acidic protein), зниженням інтенсивності синтезу глутамату, набуханням тканин мозку, змінами рівня такого протеїну, як аквапорін-4, і порушенням проникності гематоенцефалічного бар'єру (A S Hazell, Rao, Danbolt, Pow, & Butterworth, 2001).

Робилися неодноразові спроби оцінити, який внесок згадані чинники вносять в розвиток патологічних змін в нервових клітинах при ТД і хвороби Верніке-Корсакова. Проте тіамін вже давно вважається необхідним компонентом терапії пацієнтів з хворобою Верніке-Корсакова (Latt & Dore, 2014; Rees & Gowing, n.d.).

Хоча багато чинників сприяють розвитку ТД за умов хронічного алкоголізму, інгібування процесу поглинання нирками та кишківником тiamіну також може бути одним із них, а дослідження на щурах показало, що хронічне споживання алкоголю призводить до збільшення виведення тiamіну з сечею (Abe & Itokawa, 1977). Спостерігається також зниження ниркових THTR1 та THTR-2 на рівні експресії мРНК у щурів що споживають алкоголь та зниження рівня експресії ТПК в епітеліальних клітинах (Laforenza, Patrini, Gastaldi, & Rindi, 1990). Зниження утворення ТДФ за хронічного алкоголізму підтверджується помітним зниженням активності ПДК, ОГДК та транскетолази в мозку хворих з діагнозом синдрому Верніке-Корсакова, що, в свою чергу, призводить до роз'єднання функції мітохондрій в нервових клітинах та окислювального стресу (Alan S Hazell & Butterworth, n.d.). Однак варто зазначити, що на відміну від ефекту хронічного вживання алкоголю на рівні експресії для THTR1, THTR2 та ТПК, споживання алкоголю не впливало на рівень експресії мітохондріального транспортеру ТДФ (Subramanian, Subramanya, Tsukamoto, & Said, 2010).

Незважаючи на те, що ТД часто ототожнюється з хронічними алкогольними захворюваннями (Bâ, 2011; R F Butterworth, 1995; P J Mulholland et al., 2005), ТД є більш ефективним, ніж алкоголь, при затримці як внутрішньоутробного, так і постнатального росту. Це відбувається за рахунок індукції мікроенцефалії, затримки клітинної диференціації, порушення аксогенезу, синаптогенезу та пошкодження нервової тканини (Bâ, 2008, 2012; Roecklein, Levin, Comly, & Mukherjee, 1985). Це не виключає, що обидва патогенні стани надають синергічні шкідливі дії на розвиток мозку і тіла плоду (Bâ, 2009; Roecklein et al., 1985). Спостереження демонструють, що алкоголь і ТД викликають два різні механізми загибелі клітин: алкоголь сприяє нейроапоптозу, тоді як ТД викликає як нейроапоптоз так і некроз клітин. Патологічні стани можуть впливати синергічно, щоб спровокувати клітинну смерть та некроз тканин, спричинених зловживанням алкоголю (Bâ, 2017).

1.5.1. Хвороба Паркінсона

Хвороба Паркінсона (ПД) - це прогресуючий нейродегенеративний розлад, який проявляється клінічно моторними (брадикінезія, тремор, жорсткість м'яз, поза згинання та постуральної нестабільності) та немоторними симптомами (у тому числі порушення нюху, порушення сну, порушення шлунково-кишкового тракту та сечовивідних шляхів, серцево-судинна дисфункція, втома, біль, депресія та розлади настрою). Щодо патологічних характеристик, то відбувається, зокрема, дегенерація дофамінергічних нейронів в substantia nigra. Немоторні симптоми з'являються до або паралельно з руховим дефіцитом (Luong & Nguyễn, 2013; Zahr et al., 2016).

Виявлено низку факторів, що пов'язують ТД з ПД (Lu'o'ng & Nguyễn, 2012). Наприклад в нігральних нейронах пацієнтів з ПД спостерігається зниження активності тіаміндіфосфатзалежних ензимів (головним чином, а-кетоглутаратдегідрогенази) (Mizuno et al., 1994), причому було продемонстровано, що це зниження не пов'язане з недоїданням хворого (Roger F Butterworth, 2003b). Пацієнти з ПД, які пройшли терапію леводопою (L-dopa), демонструють значно більший рівень ТДФ у цереброспінальній рідині та більш високий загальний вміст тіаміну, ніж пацієнти, які не лікуються цим препаратом (Jiménez-Jiménez et al., 1999). В пацієнтів з деменцією паркінсонального типу активність ТПК була значно знижена у фронтальній корі (Laforenza et al., 1992). Крім того, Gold et al. (M. Gold et al., 1998) повідомили, що хворі з ПД мають низький вміст тіаміну у плазмі та у цереброспінальній рідині (70% та 33% від норми відповідно). Інші результати дозволяють припустити, що тіамін може мати нейропротекторну роль у ПД, збільшуючи експресію апоптотичного інгібітора Bcl-2. Як відомо, Bcl-2 - мембранний протеїн, який відіграє нейропротекторну роль у ЦНС. Bcl-2 пригнічує апоптоз і підвищує виживання новоутворених нейронів в нормі та ішемічному гіпокампі (Sasaki et al., 2006). Тіамін відіграє позитивну роль в ПД, спонукаючи вивільнення дофаміну і поліпшення симптомів, пов'язаних з ПД. Тіамін також впливає на ПД через негеномні механізми (Lu'o'ng & Nguyễn, 2012).

Відсутність дефіциту тіаміну у крові на початковому етапі розвитку хвороби та ефективність безперервної терапії пацієнтів великими дозами тіаміну можуть свідчити про те, що симптоми ПД є проявом нейронального ТД, ймовірно, через дисфункцію активного внутрішньоклітинного транспорту тіаміну. Також експериментальні дані показали підвищення виділення допаміну в стріатумі щурів після інтрастріального введення тіаміну (Yamashita, Zhang, & Nakamura, 1993). Ін'єкція високих доз тіаміну хворим з ПД мала добре виражений ефект, котрий проявлявся у суттєвому зменшенні як моторних так і немоторних симптомів, що дозволяє припустити, що аномалії в процесах, що залежать від тіаміну, можуть бути подолані дифузійно-опосередкованим транспортом при введенні надфізіологічних концентрацій тіаміну (Costantini, Pala, Compagnoni, & Colangeli, 2013). Можливо, що покращення енергетичного обміну нейронів в substantia nigra за умов введення високих доз тіаміну може привести до посилення синтезу та вивільнення ендогенного допаміну та підвищення активності тиамінзалежних ензимів (Costantini et al., 2015).

1.6. АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ ЩОДО НЕЙРОТРОПНОСТІ ТІАМІНУ

1.6.1. Тіамін та цитоскелет

З урахуванням згаданої вище гіпотези про спряження функціонування мобільного пулу тіаміну з функціями нервових клітин досить перспективним є напрямок вивчення взаємодії біологічно активних похідних тіаміну з протеїнами, що забезпечують динамізм структури нервової клітини, насамперед – цитоскелетом. Перші спостереження в цьому аспекті стосуються взаємодії ТДФ і ТТФ з актоміозином і міозином (Murai & Katsura, 1975). Автори цитованої роботи виявили ТТФазную активність молекул міозину і здатність фосфатів тіаміну в певних концентраціях викликати преципітацію актоміозину. Набагато пізніше Ромеро і співавт. (Rist et al., 1997) на культурі клітин Rbe4 показали, що семиденна інкубація цих клітин в тіаміндефіцитному середовищі з додаванням піритіаміну призводила до істотного зниження вмісту F-актину. Спостережувані зміни проникності мембран і вмісту F-актину в клітинах Rbe4, культивованих в умовах B_1 -дефіциту, автори розглядають як непрямі вказівки на можливість залучення гематоенцефалічного бар'єру у патогенез енцефалопатії, що спостерігається при дефіциті тіаміна. На підставі спостережень, зроблених в умовах *postmortem*-дослідженнях тканин мозку хронічних алкоголіків, алкоголіків з синдромом Верніке-Корсакова і контрольних осіб відповідного віку, вчені (Cullen & Halliday, 1995) прийшли до висновку щодо тіамінзалежності механізму накопичення тау-протеїнів і клітинної загибелі у холінергічних структурах переднього мозку осіб з синдромом Верніке-Корсакова. На тлі вивчення внеску тіаміну (та відповідно його нестачі) у функціонуванні нервових клітин ми зосередилися на двох протеїнах цитоскелету що є нейроспецифічними – гліальний фібрилярний кислий протеїн (GFAP) та триплет нейрофіламентів (NF).

1.6.1.1. Тіамін та гліальний фібрилярний кислий протеїн

GFAP – це маркер функціонального стану астроцитів, який є основним проміжним компонентом фібрил астроцитарного цитоскелету. Hazell та ін. продемонстрували (Afadlal et al., 2014; Alan S Hazell, n.d.), що астроцити є найбільш чутливими до ТД клітинами у нервовій тканині, а їх дисфункція за умов ТД відіграє провідну роль у патофізіологічних процесах, що супроводжують його розвиток. На симптоматичних стадіях ТД (9-14 днів) рівень GFAP залишається незмінним (A S Hazell et al., 2001) або має тенденцію до зростання (Q. Chen, Okada, & Okeda, 1997; Ferguson, Dalve-Endres, McRee, & Langlais, 1999; Vetreno, Ramos, Anzalone, & Savage, 2012). Надекспресія GFAP відбувається на фоні значного зниження кількості нейронів, яке оцінювали за визначенням нейронального маркеру NeuN. Однак, як і у випадку впливу етанольної інтоксикації, за розвитку більш глибокого ТД кількість GFAP - позитивних клітин значно знижується (Afadlal et al., 2014). Узагальнюючи наведені літературні дані, можна дійти до висновку, що початкові стадії алкогольної енцефалопатії та ТД характеризуються активною проліферацією астроцитів, яка може розглядатися як компенсаторна відповідь ЦНС, спрямована на компенсацію метаболічних порушень. Глибокі порушення обмінних процесів, що супроводжуються загибеллю клітин, призводять до пригнічення функції глії та незворотних змін їх цитоскелетних структур.

1.6.1.2. Тіамін та триплет нейрофіламентів

Цитоскелет нейрона складається головним чином з нейрофіламентів, мікротрубочек і актину. Нейрофіламенти складаються з поліпептидних ланцюгів або субодиниць, які належать до однієї і тієї ж сім'ї протеїнів. Вони, як вважають, працюють, перш за все, для забезпечення структурної підтримки аксону і регулювання його діаметра. Три основні субодиниці нейрофіламентів були виявлені при дослідженні аксонального транспорту. Їх назви, базуються на їх молекулярній масі, визначеній за допомогою SDS-PAGE: легка (NF-L) - 68-70 кДа, середня або проміжна (NF-M) проходить біля 145-160 кДа, важка (NF-H) - 200-220 кДа.

Молекулярна маса триплетних протеїнів SDS-PAGE змінюється між видами ссавців, причому більші види, як правило, мають більш важкі протеїни. Реальна молекулярна маса цих протеїнів значно нижча, ніж оцінюється на основі рухливості SDS-PAGE, особливо у випадку з NF-H та NF-M. Це пов'язано із сильно зарядженими С-кінцевими областями молекул. Всі три триплетні протеїни містять довгі ділянки поліпептидної послідовності, багаті на залишки глютамінової кислоти, а NF-M і, особливо, NF-H також містять багатократно повторювальні ділянки фосфорильованного серину.

І якщо зміни вмісту астроцитарного маркера за умов ТД та алкоголізму досліджувались, то дані впливу вищезначених патологічних станів на протеїни триплету дуже обмежені. Відомо, що за умов чотирьохденного споживання алкоголю кількість NF-позитивних клітин достовірно не відрізнялась від контрольної групи, хоча тканина мозочку вже мала нейродегенеративні ознаки (Oyinbo, Igbigbi, & Awioro, 2016). Іншою групою вчених було виявлено, що у щурів, котрі мають схильність до вживання алкоголю, вміст триплету був у середньому на 20-50% нижчий за тих, хто не має такої схильності (Guitart, Lumeng, Li, & Nestler, 1993). Також було продемонстровано на культурі клітин гіпокампусу, що етанол в концентрації більш ніж 1,8% пригнічував NF-позитивні клітини (вміст усіх трьох протеїнів знижувався на 32-47%), тоді як використання розчину з концентрацією менш ніж 1% не мало жодного ефекту (Saunders, DiCerbo, Williams, & Hannigan, n.d.). Споживання 20% розчину етанолу самицями протягом вагітності та лактаційного періоду призводило до гіперфосфорильовання протеїнів триплету та GFAP у щурят (Reis et al., 2015). Можливість часткового відновлення, або навіть нормалізування рівню цих протеїнів при введенні тіаміну наразі не досліджена, та невідомо, які дози та термін для цього потрібні.

Згадані вище спостереження, наводять на думку про те, що тіамін або його біологічно активні похідні є необхідними учасниками процесів функціонування протеїнів цитоскелета. Включення похідних вітаміну B₁ в некоензимні процеси

на додаток до його коензимної ролі могло б пояснити відсутність надійної кореляції між позитивним ефектом тіаміну у деяких пацієнтів, які страждають нейродегенеративних захворюваннями, з одного боку, і активністю ТДФ-залежних ензимів і рівнем ТДФ в мозку таких пацієнтів - з іншого (Haas, 1988; I. M. Parkhomenko, Donchenko, et al., n.d.; Yulia M Parkhomenko et al., 2011).

Вищенаведені факти та припущення вказують на те, що для з'ясування молекулярних механізмів високої нейроактивності вітаміну B₁ необхідно дослідити взаємодію його біологічно активних похідних та, ймовірно, протеїнів його обміну із структурними протеїнами, що забезпечують динамічність клітин, насамперед – протеїнами цитоскелету . Ми вважаємо, що для цього є доцільним з'ясувати, чи відбуваються зміни у рівні нейроспецифічних протеїнів цитоскелету в умовах різного тіамінового статусу організму (зокрема, за дефіциту тіамну різної глибини та етіології та за ведення тіаміну на цьому фоні) та порівняти їх зі змінами у рівні та експресії протеїнів тіамінового метаболізму. Саме тому, метою нашого дослідження було оцінити зміни в рівні, експресії та активності протеїнів нервових клітин, що беруть участь в обміні тіаміну, та окремих нейроспецифічних протеїнів цитоскелету при різній забезпеченості організму тіаміном .

Розділ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Тваринні та клітинні моделі розвитку тіамін-дефіцитних станів та схеми введення коригуючих речовин.

2.1.1. Моделі аліментарного дефіциту тіаміну

У експериментах використовувались дві тваринні аліментарні моделі ТД: аліментарний гіповітаміноз (Hv-T) та аліментарний авітаміноз (Av-T).

В обох випадках ми використовували молодих самців щурів лінії Wistar з початковою масою тіла 75-85 г. Дієта Габлера (Bai, Bennion, & Gubler, 1971) була використана як основа раціону для розвитку аліментарного ТД. Композиція дієти була наступною: сахароза (68,7%); казеїн (22%); сольова суміш (4,5%); бавовняна олія (5%); суміш вітамінів (0,22%) та хлорид холіну (0,4%). Сольова суміш містила 33,0% CaCO_3 , 35,82% K_2HPO_4 , 11,3% $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 18,6% NaCl , 3,05% $\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,09% KI , 0,42% $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,03% ZnCl_2 і 0,03% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Вітамінна суміш містила 88% інозиту, 4% п-амінобензойної кислоти, 2,6% кальцію пантотенату, 1,7% нікотинової кислоти, 0,26% піридоксину, 0,5% рибофлавіну, 0,001% біотину, 0,02% фолієвої кислоти, 0,17% 2-метил-1, 4-нафтохінону, 0,9% ретинолацетату і 0,06% ергокальциферолу. В обох моделях використовувався парно кормлений контроль, котрий щоденно отримував тіамін додатково до дієти (перорально по 200мкг тіаміну розчиненого у фізіологічному розчині). Для моделі Hv-T до TD - дієти додавали тіамін у дозі 200 мкг на 1 кг корму - ця доза відповідає 15-20% добової потреби тварин у тіаміні (добова потреба – 20-30 мкг на добу; середнє споживання їжі щурами - близько 15-20 г на добу) (Zapadnyuk IP, Zapadnyuk VI, 1983). Тривалість експерименту для моделі Av-T становила чотири тижні, для Hv-T – шість тижнів. Тварини утримувались в індивідуальних клітках з сітчастим дном задля запобігання копрофагії. Всіх тварин зважували два рази на тиждень протягом означеного інтервалу часу.

Задля перевірки зворотності змін у досліджуваних показниках, що розвинулись підчас ТД станів, за добу до декапітації частина щурів отримала розчин тіаміну у кількості 2,0 мг / кг ваги тварини. Для кожної моделі було проведено три незалежні серії експериментів і кількість тварин в кожній з груп (контроль, ТД, ТД+В₁) становила n = 6-7.

2.1.2. Модель хронічного алкоголізму

Для відтворення моделі хронічного алкоголізму на щурах тваринам упродовж 9 місяців давали 15 % розчин етанолу, як єдине джерело рідини в той час як контрольна група вживала чисту воду. За добу до декапітації тварин, що вживали етанол, було поділено на чотири групи: алкогольна (ХА), з введенням тіаміну в кількості 2 мг/кг ваги (ХА+Т), з введенням Метовітану в кількості 2 мг/кг ваги (ХА+М) та з введенням обох у тих же кількостях (ХА+Т+М).

2.1.3. Клітинна модель дефіциту тіаміну

Для моделі використовувалась клітинна лінія нейробластоми миші (Neuro 2a, ATCCSSC 131). Клітини вирощували (10 ° C, 5% CO₂ / 95% повітря) у 100-мм чашках Петрі (Нунк, Роскильда, Данія) в 10 мл зміненого середовища Дульбекко (GIBCO, Ghent, Бельгія), що містить 10 μМ тіаміну (значення, надане виробником і перевірене за допомогою HPLC), збагачене глюкозою (6 мг / мл) і доповнене 5% телячої сироватки (GIBCO). ТД клітини виробляли шляхом вирощування їх у спеціально замовленому модифікованому середовищі Дульбекко, позбавленому тіаміну (GIBCO). Середовище міняли кожні 2 дні, клітини підкультурували кожні 4 дні. Частині ТД клітин до середовища додавали 50 μМ тіаміну (ТД + Т) та залишали в інкубаторі на 24 години.

2.2. Матеріали та обладнання

У роботі були використані наступні реактиви: іонно-обмінна смола IRC-50, кисла фосфатаза, 2'7'-дихлорфлуоресцеїну діацетат (H2DCF-DA, Sigma, США), реактив Еллмана, апопіруват-декарбоксилаза з пивних дріжджів *Saccharomyces*

carlsbergensis (отримували за описаним нижче методом), ТДФ- стандарт, АМФ, MgSO₄, Tris, трихлороцтова кислота (ТСА), ПААГ, SDS, нітроцелюлозна мембрана, 0,1% Tween 20 (PBST, Sigma, США), моноклональні анти-TPK1, Abcam, США, моноклональні anti-NF, Sigma, США, поліклональні анти-THTR1, Sigma, США) та поліклональні анти-GFAP (Santa Cruz Biotech, США), анти-кролячі, № 9169; Sigma, США, моноклональні anti-ТПК, Thermo, США. Решта реактивів виробництва ALC (США), Sigma (США), Pierce (США) та вітчизняного виробництва класу х.ч. або ч.д.а. Для приготування водних розчинів використовували бідистильовану або деіонізовану воду.

Вимірювання було здійснено за допомогою наступного обладнання: спектрофлуориметр PerkinElmer LS-50 (США), (система 522, Kontron Instruments, Мілан, Італія), колонці PRP-1 (Ø 4,16150 мм, Hamilton Co, Reno, NV, США), флуорометричний спектрометр (LS-4, PerkinElmer, Shelton, CT, USA, або SFM 25, Kontron Instruments), камері для вертикального електрофорезу, TV100Y (Scie-Plus, Великобританія), рідинний сцинтиляційний лічильник (SL-20 «Intertechnique», Франція), ваги електронні WPS 110/C/2 (RADWAG, Польща), центрифуга Mikro 200R (Hettich, Німеччина) та LU-418 (Угорщина), змішувач Bio Vortex V1 (BIOSAN, Німеччина), шейкер-термостат ES-20 (BIOSAN, Німеччина), водяна баня БЛ-100 (НХП, Україна), рН-метр «рН-301» (ПБФ «ДЕСКК», Україна), спектрофотометр СФ-46 (ЛОМО, Росія), фотоелектроколориметр КФК-2МП (ЗОМЗ, Росія), ультразвуковий дезінтегратор Labsonic M (Sartorius, Німеччина), мікропланшетний зчитувач ER-500 (SINNOWA, Китай), протоковий цитофлуориметр COULTER EPICS XL EPICS XLTM (Beckman Coulter, США), конфокальний мікроскоп Carl Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Німеччина) спектрофотометр/флуориметр для вимірювання концентрацій протеїну та РНК DS-11 (DeNovix, США), ампліфікатор qTOWER 2.0 Standard RT-PCR Thermal Cycler (Analytik Jena AG, Німеччина) та інші.

2.3. Методи досліджень

2.3.1. Кількісне визначення протеїну

Вміст протеїну визначали за методом (LOWRY, ROSEBROUGH, FARR, & RANDALL, 1951) Lowry O. та спектрофотометрично при 280 нм (Abdelhameed et al., 2017; Severin SE, 1989).

2.3.2. Визначення вмісту тіаміну

Щоб оцінити вміст тіаміну в печінці щурів, тканина печінки була гомогенізована; тіамін та його фосфати екстрагували шляхом кип'ятіння в кислому середовищі. Для гідролізу фосфорних ефірів тіаміну, зразки інкубували протягом 18 годин з кислотою фосфатазою ($\text{pH}_{\text{опт}}$ 4,5); потім осад відокремлювали центрифугуванням. Супернатант наносили на іонообмінну смолу IRC-50; після промивання тіамін елюювали 0,1М HCl. Оцінка вмісту тіаміну в елюатах з колонки проводилась з використанням відомої тіохромної методики (І. М. Parkhomenko, Stepuro, Donchenko, & Stepuro, n.d.).

2.3.3. Визначення параметрів окисно-відновного стану мозку щурів

Відносний внутрішньоклітинний рівень активних форм кисню (АФК) у головному мозку щурів оцінювали за допомогою специфічного молекулярного реагенту, 2'7'-дихлорфлуоресцеїну діацетату (H2DCF-DA, Sigma, США) (Severin SE, 1989). Інтенсивність флуоресценції вимірювали на спектрофлуориметр PerkinElmer LS-50 (США) на довжинах хвиль збудження та емісії 497 та 525 нм відповідно (проміжок між пропусканнями 2,5-5,0 нм). Вимірювання проводили при кімнатній температурі (21-23 °C).

Концентрацію груп-SH у гомогенаті мозку оцінювали за допомогою реактива Еллмана згідно з методикою, описаною раніше (Severin SE, 1989).

2.3.4. Вимірювання вмісту ТДФ та активності ТПК

Активність ТПК оцінювалася за методикою, описаною раніше (Springer, 1962). Принцип оцінки базувався на вимірюванні вмісту ТДФ, що утворився після інкубації тіаміну з препаратом, що містить ТПК (у нашому випадку, з

гомогенатами тканин). У зразках крові та гомогенатах головного мозку вміст ТДФ оцінювався за допомогою швидкого тесту з використанням апоензиму апопіруват-декарбоксилази дріжджів (apoPDC) (Severin SE, 1989). Аліквоти гомогенатів головного мозку або зразків (у випадку оцінки активності ТПК після інкубації з тіаміном) інкубували в фосфатному буфері з додаванням апоензиму протягом 30 хв. Ензиматична оцінка ТДФ базувалась на рекомбінації останнього як коензиму з apoPDC та на реакції з алкогольдегідрогеназою у присутності надлишку пірувату. Реакція оцінювалась за окисненням NADH_2 . Апопіруват-декарбоксилаза для вимірювання вмісту ТДФ була отримана з пивних дріжджів (*Saccharomyces carlsbergensis*) (Severin SE, 1989) і зберігалася у вигляді сульфатної пасти при -20°C ; Апоензим одержували з пасти безпосередньо перед експериментом. Кількість утвореного ТДФ розраховували відповідно до калібрувальної кривої, побудованої з використанням ТДФ-стандарту.

2.3.5. Зв'язування $[^{14}\text{C}]$ тіаміну плазматичною мембраною синапсом
Накопичення міченого $[^{14}\text{C}]$ тіаміну цільними синапсами або їх плазматичними мембранами проводили за описаною раніше методикою (Protasova, Parkhomenko, Donchenko, & Churilova, n.d.). Фракції інкубували при 37°C з 0,4–4 мМ $[^{14}\text{C}]$ міченим тіаміном (питома радіоактивність 25,7 л / мМ) в 0,05 М Ringer-бікарбонатному буфері, pH 7,4, що містив (в мМ): NaCl, 125; KCl, 4,5; CaCl_2 , 2,5; KH_2PO_4 , 1,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,3; NaHCO_3 , 17,6; глюкоза, 10. Фонову радіоактивність визначали в контрольних зразках, де немічений тіамін додавали в 100-кратному надлишку над міченим тіаміном. Зв'язування тіаміну припиняли через 5 хв шляхом додавання 2 мл безтіамінового крижаного середовища на крижаній бані. Екстра-везикулярний тіамін видаляли шляхом швидкої фільтрації через фільтр Whatman GF / C з наступним промиванням 6 мл крижаним інкубаційним середовищем у відсутності тіаміну. Після сушіння на повітрі фільтри поміщали в сцинтиляційні рідкі флакони, і радіоактивність, захоплену на фільтрах, вимірювали рідинним сцинтиляційним лічильником (SL-20 «Intertechnique», Франція). Специфічне поглинання тіаміну везикулами,

виражене як pmol тіаміну на мг протеїну на час (5 хв), визначали після віднімання фонові радіоактивності в контролі.

2.3.6. Електрофорез та Вестерн-блот аналіз

Протеїни розподіляли відповідно до їх молекулярних мас, використовуючи електрофорез у 10% поліакриламідному гелі (ПААГ) в умовах денатурації з 0,1% додецилсульфатом натрія (SDS), за методом Лаемлі (Laemmli, 1970) в камері для вертикального електрофорезу, TV100Y (Scie-Plus, Великобританія). Зразки для електрофорезу перед нанесенням на гель піддавали чотирикратному розбавленню буфером для зразків, що містить 125 мМ Трис-НСІ (рН 6,8), 20% гліцерину, 10% SDS, 0,2 М дітіотреїтолу та 0,1% бромфенольного синього і нагрівали 5 хв при 95°C. Зразки наносили в кількості 100 мкг протеїну на трек. Вхід протеїну в гель відбувалося при 80 В а подальше розділення при 100 В. В якості електродного буфера використовували розчин наступного складу: 25 мМ Трис-НСІ (рН 8,3), 195 мМ гліцину та 0,1% SDS. Для електропереносу протеїнів ми використовували нітроцелюлозну мембрану. Електроперенесення відбувалося при 100 В протягом 2 годин у буфері, що містить 10 мМ NaHCO₃, 3 мМ Na₂CO₃ та 20% етанолу. Сайти неспецифічної сорбції мембрани блокували протягом 2 год розчином фосфатного буферу (PBS) з додаванням 0,1% Tween 20 (PBST, Sigma, США). Потім мембрану промивали PBST, інкубували з відповідними первинними антитілами (моноклональні анти-TPK1, Abcam, США, моноклональні anti-NF, Sigma, США, поліклональні анти-THTR1, Sigma, США) та поліклональні анти-GFAP (Santa Cruz Biotech, США) протягом 16 годин при +4°C. Антитіла, що не зв'язалися, видаляли, промивши PBST (п'ять разів, 3 хв); Після цього інкубували з вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому (анти-кролячі, № 9169; Sigma, США). Після промивання імунореактивні зони були візуалізовані за допомогою набору ECL; результат фіксували на рентгенівських плівках. Блоти GFAP було проявлено з використанням системи діамінобензидин + H₂O₂.

2.3.7. Імуногістохімія

Парафінові секції відділів головного мозку депарафінували в ксилолі протягом 3 хв два рази (використовували суміш ксилолу-етанолу (1: 1)), регідрували в розчинах етанолу (96%, 75% і 50%) по 3 хвилини у кожному, та поміщали до бідистильованої води на 5 хв. Для вилучення антигену секції нагрівали в мікрохвильовій печі в 25 мМ тріс-НCl-буфері, (pH 7,4; містить 5 мМ EDTA та 0,25% тритону X-100), протягом 1 хв при 600 Вт. Секції промивали PBS, блокували в 3% BSA протягом 1 години при 37 ° С. Після промивання в PBS секції інкубували з первинними анти-GFAP-антитілами (1: 100) при 4 ° С протягом ночі. Після препарати тричі промивали PBS, з подальшою інкубацією 1 год із вторинним FITC -кон'югованим антитілами (1: 250) при 37 ° С. Після промивання секцій у PBS двічі ядра контрастували за допомогою Hoechst 33258 (1 мкг / мл PBS) протягом 5 хв при кімнатній температурі, потім промили в PBS та в бідистильованій воді. Для контролю неспецифічного зв'язування зрізи інкубували без первинних антитіл. Візуалізація відбувалася за допомогою конфокальної лазерної скануючої флуоресцентної мікроскопії. Зображення обробляли з використанням програмного забезпечення Zeiss ZEN 2009 Light Edition. Кількісний аналіз забарвлення GFAP проводили з використанням програмного забезпечення ImageJ 1.47h. та розраховували як відношення зеленого флуоресцентного сигналу (GFAP) до синього флуоресцентного сигналу ядер (G / B).

2.3.8. Імуноцитохімія

Від клітин лінії мишачої нейробластоми забирали середовище, промивали PBS. Задля фіксації додавали 4% розчин PFA та залишали на 10 хвилин. Зафіксовані клітини тричі промивали PBS. Скельця переміщали на парафільм та додали PBS задля запобігання пересиханню. Неспецифічне зв'язування блокували 0,1 М осячкою сироваткою, розчиненою у PBS що містив 0,3% Triton та 0,1% Tween, 60 хвилин за кімнатної температури. Первинні антитіла (моноклональні anti-ТПК, Thermo, США) розводили у блокуючому розчині (1:50), додавали на скельця та залишали на ніч при 4°C. Промивали трічі з PBS, додавали вторинні антитіла

(розведення 1:1000, флюорофор-кон'юговані поліклональні anti-rabbit), Sigma, США), інкубація – 60 хв, кімнатна температура). Повторно промивали, для забарвлення ядер додавали розчин (1:5000) DAPI у воді, промили дистильованою водою. Скельця залишали до повного висихання. Візуалізували клітини за допомогою флуоресцентного мікроскопа використовуючи відповідні фільтри.

2.3.9. Отримання фракцій РНК

В пробірку об'ємом 1,5 мл вносили 100 мкл досліджуваного зразка, додавали 1 мл Trizol реагенту і інтенсивно перемішували вміст пробірки до появи гомогенної емульсії. Пробірку з сумішшю залишали при 4⁰ С на 5 хв. Додавали в пробірку 200 мкл хлороформу і перемішували. Переносили пробірку на 4⁰ С на 5 хв. Центрифугували пробірку з сумішшю 5 хв при 14000 об / хв для розшарування фаз. Прозору верхню фазу з РНК переносили, не зачіпаючи прикордонну між фазами білу плівку з ДНК і протеїнами, в чисту пробірку об'ємом 1,5 мл. Додавали в пробірку рівний обсяг ізопропанолу, близько 600 мкл. Перемішували вміст пробірки і переносили в морозильник на -20⁰ С на 30 хв. Центрифугували 15 хв при 14000 об / хв. Повністю видаляли супернатант. Додавали в пробірку 1 мл холодного 75% етилового спирту, перемішували вміст, центрифугували 5 хв при 14000 об / хв і обережно видаляли супернатант. Посушували осад при температурі 65⁰ С протягом 3 мін. Виділену РНК зберігали при температурі -70⁰ С.

2.3.10. Синтез к-ДНК (зворотня полімеразна ланцюгова реакція)

Перед синтезом к-ДНК отриману РНК перевели в водну фазу (додаванням 75% етанолу, видаленням супернатанту та розчиненням осаду у 20-30 мкл води) та виміряли концентрацію. Зворотню ПЛР проводили з використанням ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit (Biolabs, New England) за протоколом виробника. Для цього змішували РНК зразку (1 µg) з оліго –ДТ праймерами (по 2 µl на зразок) та доводили безнуклеазною водою до загального об'єму 8 мкл. Денатурували РНК за температури 65⁰С 5 хвилин, швидко перемішували за

допомогою Вортексу та розміщали епендорфи на лід. До зразків додавали ProtoScript II Reaction Mix (2X) 10 μ l та ProtoScript II Enzyme Mix (10X) 2 μ l. Зразки центрифугували, інкубували при 25 ° C протягом 5 хвилин, та годину при 42°C. Ензим інактивували інкубацією при 80°C протягом 5 хвилин. Отриману к-ДНК зберігали до використання при -20°C.

2.3.11. Кількісна полімеразна ланцюгова реакція

кДНК зразків використовували для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Експеримент було проведено з використанням GoTaq qPCR masterMix (Sybrgreen from Proméga) за протоколом виробника. Перелік праймерів наведено у таблиці 2.1.

Табл.2.1

Перелік праймерів для проведення кількісної ПЛР у реальному часі

Цільовий ген	Прямий праймер (for)	Зворотній праймер (rev)
ТПК-1	TCCAGCCGCCATTGTAACC	GATTGGCACCTCCATCAGCA
SLC19A2 (THTR-1)	CAGGGATTGTGGGAGAAGGT	ATAACCAACCGCAAACACAGC
HPRT	CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC	TTCGCTGATGACACAAACATGA

Зразки ДНК розводили у 10 разів безнуклеазною водою. Окремо змішували Cyber Green (CG) mix з праймерами (на лунку 6 μ l: 5 μ l CG + 0,5 μ l for +0,5 μ l rev). У кожен лунку до 6 μ l міксу додавали 4 μ l ДНК (у негативний контроль 4 μ l води). Всі додавання та розведення проводили на льоду. Плашку зі зразками закривали плівкою та центрифугували 2 хв.

Параметри циклів ПЛР були наступними: денатурація 5 хв при 95°C та 50 циклів з трьох етапів (15 с при 95 °C, 15 с при 60 °C та 45с при 72 °C), та заключний цикл 5 хвилин при 72 °C (T3000 Thermocycler, Biometra GmbH, Геттинген, Німеччина).

Результати кількісно обробляли за загальновідомим методом $\Delta\Delta Ct$ (Livak & Schmittgen, 2001), та статистично аналізували в програмі MS Excel.

2.3.12. Методи статистичного аналізу

Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами статистики (Kokunin, n.d.). Розраховували значення середніх арифметичних (M) та їх середніх квадратичних похибок (m). Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій t Стюдента. Значення $p < 0.05$ вважали вірогідним.

Для розрахунків та графічної презентації одержаних результатів були використані комп'ютерні програми Microsoft Excel та Origin Pro 8.6.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Загальна характеристика використаних в роботі тваринних моделей ТД

Відомо, що глибокий аліментарний дефіцит тіаміну призводить до розвитку хвороби бері-бері, що характеризується низкою порушень з боку нервової та серцево-судинної систем (Polegato et al., 2019). Оскільки нервова система є особливо чутливою до нестачі тіаміну, основним об'єктом наших досліджень було обрано головний мозок та три його відділи: кора великих півкуль, мозочок та гіпокамп. В даній роботі в експериментах з тваринами ми прагнули використати моделі ТД, наближені до реальних ситуацій, які можуть виникати у людини. Саме тому для отримання моделей класичного В₁-авітамінозу (Av-T) та гіповітамінозу (Hv-T) ми використовували не введення щурам антагоністів тіаміну, як це часто робиться в лабораторних умовах (Ke, Wang, Fan, & Luo, 2009; Nunes, Gómez-Mendoza, Rezende, Figueiredo, & Ribeiro, 2018; Toledo Nunes, Vedder, Deak, & Savage, 2019), а спеціальні дієти, які або не містили взагалі, або містили лише незначну кількість вітаміну В₁ (описано в розділі 2 - «Матеріали та методи»). Третій модельний стан дефіциту тіаміну, який був нами використаний – це хронічний алкоголізм. Накопичені на цей час експериментальні дані переконливо свідчать, що саме ТД і порушення обміну цього вітаміну при тривалому вживанні алкоголю часто є причиною розвитку хвороби Корсакова-Вернике.

На трьох вищевказаних моделях ТД ми аналізували наступні показники: загальну вагу тварини (в динаміці розвитку моделі або наприкінці), вміст тіаміну у печінці або ТДФ в тканині мозку, вміст відновлених SH-груп (відображає вміст відновленого глутатіону (Kulinskii & Kolesnichenko, n.d.)), рівень активних форм кисню (АФК).

З метою перевірити функціональний стан клітинних структур, відповідальних за перетворення вітаміну В₁, за добу до декапітації в серії дослідів з аліментарним авітамінозом та алкоголізмом тваринам дослідної групи вводили

тіамін в дозі 200 мкг на 100 г ваги один або разом з препаратом Метовітан у разі потреби корегувати окисно-відновний стан тканин.

3.1.1. Аліментарний авітаміноз B_1 (Av-T)

До досягнення ознак класичного B_1 авітамінозу тварини дослідної групи в цій серії експериментів утримувались на дієті біля 4 тижнів. Вже з третього тижня вони почали відчутно відставати у вазі від контрольних тварин, які утримувались на повноцінній дієті віварію (Рис.3.1).

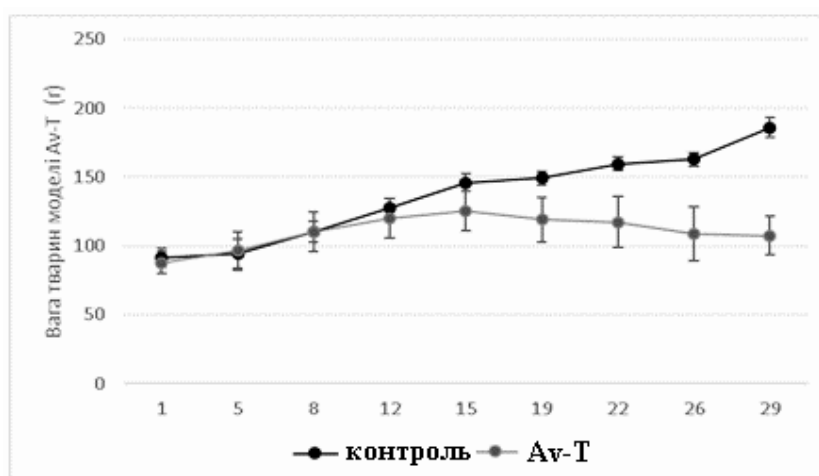


Рис.3.1 Динаміка ваги тварин контрольної та дослідної (Av-T) груп в серії з аліментарним B_1 авітамінозом. Дані представлено як $M \pm m$. ($n=6-7$).

Як можна бачити з рисунка 3.1 при середній вихідній вазі тварин 90 ± 8 г вага тварин контрольної групи наприкінці досліді дорівнювала 186 ± 7 г (210% від вихідної ваги), а дослідної - 107 ± 14 г (131% від вихідної ваги). На цей час вміст загального тіаміну в печінці суттєво зменшувався, складаючи біля 10% від такого ж показника у контрольній групі (Рис. 3.2, А). За вказаних умов відбувалось також зниження вмісту ТДФ в тканині мозку майже вдвічі, значення у групі Av-T складало 47,4% від контролю (Рис.3. 2, Б). Як видно з наведених на Рис. 3.2. даних, одноразове введення щурам тіаміну за добу до кінця досліді не призводило до нормалізації вмісту загального тіаміну в печінці та ТДФ в мозку щурів.

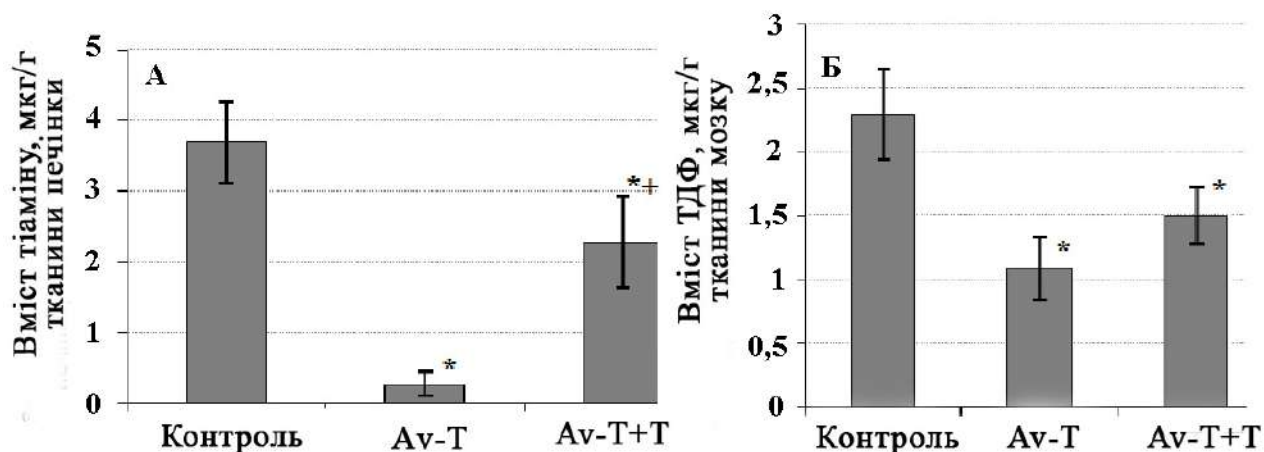


Рис.3.2. Загальний вміст тіаміну у печінці (А) та ТДФ у мозку (Б) щурів з моделлю аліментарного В₁-авітамінозу (Av-T) до та після одноразового введення 200 мкг тіаміну (Av-T + T) за добу до декапітації. Дані представлено як $M \pm m$. ($n=6-7$). * $P < 0.05$ у порівнянні з контролем, + $P < 0.05$ у порівнянні з Av-T.

Відомо, що за умов глибокого аліментарного авітамінозу організм демонструє ознаки розвитку окисного стресу, наприклад, у ТД-моделі тварин у мозку збільшується широкий спектр маркерів окисного стресу, таких як гемоксигеназа-1, супероксиддисмутаза, феритин і малоновий діальдегід (Calingasan et al., 1998; Langlais, Anderson, Guo, & Bondy, 1997; Mouton-Liger et al., 2015). Крім того, продукт перекисного окислення ліпідів, 4-гідроксинonenале (HNE), також збільшується в нейронах ЦНС (Calingasan, Chun, Park, Uchida, & Gibson, 1999). Зміни в рівнях антиоксидантних ензимів та перекисного окислення ліпідів в мітохондріях головного мозку були зареєстровані в мозку ТД тварин (Sharma, Bist, & Bubber, 2013). Також було продемонстровано, що ТД вибірково викликає окисний стрес у нейронах *in vitro* (Yang et al., 2011; Zhang et al., 2011).

Враховуючи вищевказане, ми проаналізували загальні показники Red-Ox балансу в мозку дослідних щурів. Дані наведено на Рис. 3. 3, А та Б.

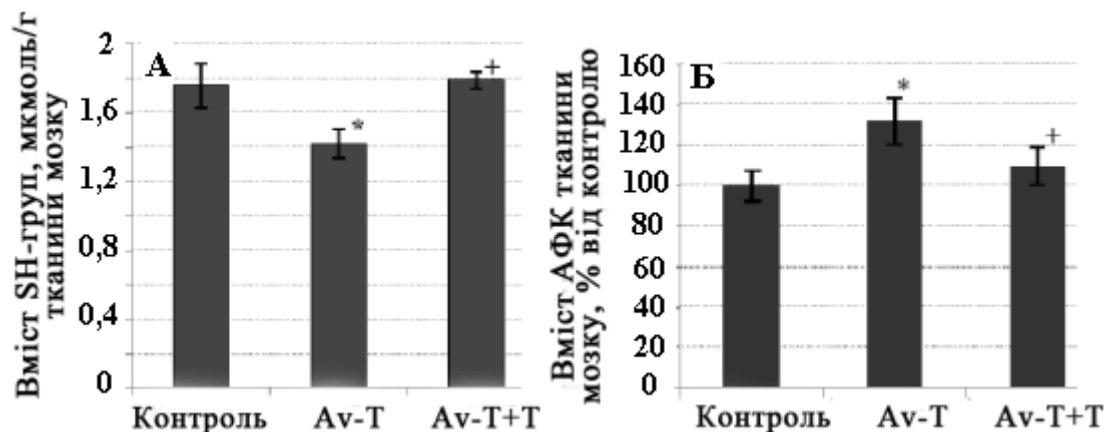


Рис. 3.3. Вміст SH-груп (А) та рівень АФК (Б) в мозку щурів з моделлю аліментарного авітамінозу (Av-T) до та після одноразового введення 200 мкг тіаміну на 1 кг ваги за добу до декапітації. Дані представлено як $M \pm m$. ($n=6-7$). * $P < 0.05$ у порівнянні з контролем, $^+P < 0.05$ у порівнянні з Av-T.

Як і очікувалось, за умов аліментарного B_1 авітамінозу спостерігається достовірний зсув цих показників, що свідчить про порушення Red-Ox балансу та наявність ознак окисного стресу, але одноразового введення тіаміну вистачає для нормалізації рівня SH-груп та АФК в тканині мозку.

3.1.2. Аліментарний гіповітаміноз B_1 (Hv-T)

Класичні форми авітамінозу B_1 в даний час зустрічаються вкрай рідко (Gaüzère & Aubry, n.d.). Але хронічне недостатнє надходження в організм вітаміну B_1 (стан гіповітамінозу) - досить поширене явище навіть в економічно розвинених країнах (Zita Weise Prinzo, 1999) і це може бути причиною накопичення негативних змін в нервових клітинах і ініціації розвитку дегенеративних процесів. У той же час метаболізм тіаміну в тканині мозку, як за умов класичного аліментарного авітамінозу, так і особливо в умовах хронічного гіповітамінозу B_1 майже не досліджений. З метою наблизитися до реальної ситуації в житті, коли організм щодня недоотримує необхідної кількості тіаміну, в наших дослідженнях ми розробили модель гіповітамінозу, коли тварини з дієтою отримували тільки 20% від необхідної кількості тіаміну (Pavlova, Stepanenko, Chekhovskaya, Tikhomirov, & Parkhomenko, 2016). При складанні дієти за основу було взято пропис ТД дієти Gubler (Bai et al., 1971), до якої було додано тіамін в дозі 200 мкг

на 1 кг корму, що з урахуванням добового споживання корму щурами в нашому випадку (близько 15-20 г) відповідало 15- 20% від їх добової потреби у тіаміні(Zaradnyuk IP, Zaradnyuk VI, 1983).

Досліди з розвитком моделі B_1 -гіповітамінозу (Hv-T) тривали біля п'яти тижнів. Дані щодо динаміки зміни ваги у експериментальних Hv-T тварин наведено на Рис. 3.5.

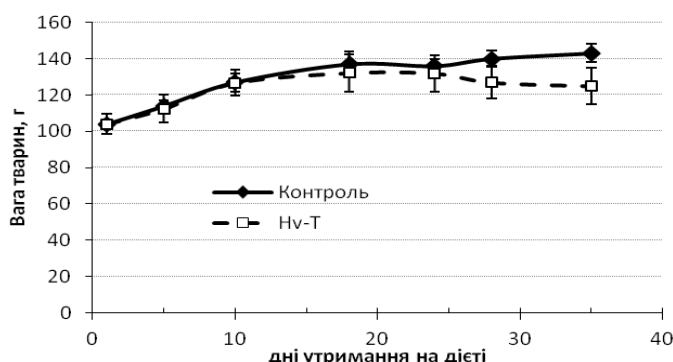


Рис. 3.5. Вага тварин з контрольної та дослідної (Hv-T) групи в динаміці утримання їх на B_1 гіповітамінозній дієті. Дані представлено як $M \pm m$. ($n=6-7$).

Отже зниження ваги щурів дослідної групи починається після 3-х тижнів утримання їх на B_1 гіповітамінозній дієті та не перевищує 10% різниці у порівнянні з контролем. На Рис. 3.6 наведено дані по динаміці зміни вмісту тіаміну в печінці та ТДФ в мозку щурів контрольної та дослідної групи щурів.

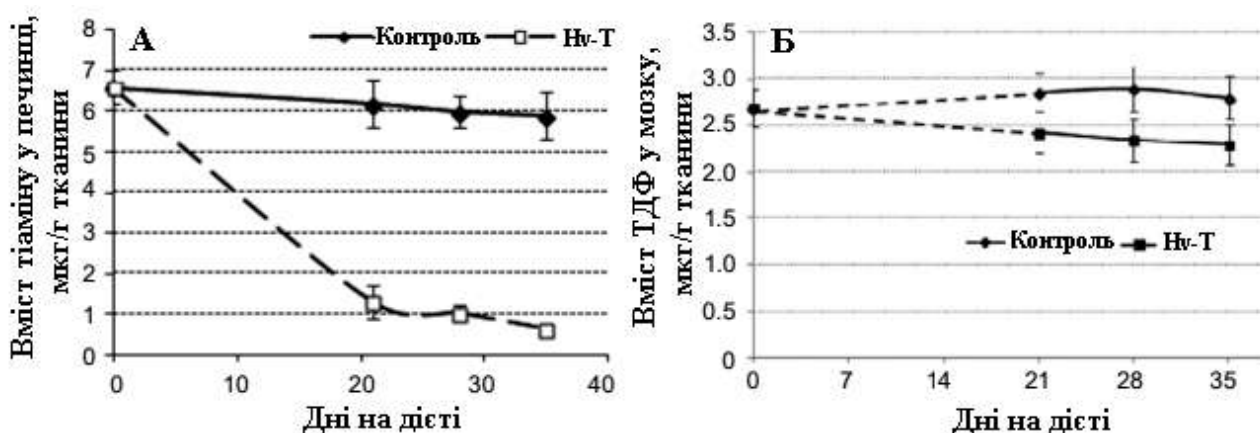


Рис. 3.6. Загальний вміст тіаміну в печінці (А) та ТДФ в мозку (Б) контрольних і дослідних щурів в динаміці розвитку гіповітамінозу. Дані представлено як $M \pm m$. ($n=6-7$).

Дані, наведені на рисунку 3.6 демонструють, що вже на 21й день розвитку Нv-Т відбувається драматичне зниження вмісту тіаміну у печінці (у 4,8 разів у порівнянні з показником контролю), тоді як вміст ТДФ у гомогенаті мозку починає знижуватись лише після четвертого тижня утримання щурів на Нv-Т дієті, та до кінця експерименту різниця у показниках між контрольною та Нv-Т групою не перевищує 15-20%. Ці дані демонструють, що під час нестачі тіаміну організм намагається підтримати адекватний рівень вітаміну (та, відповідно, його коензимної форми) навіть у випадку (та, можливо, за рахунок) «збіднення» решти тканин.

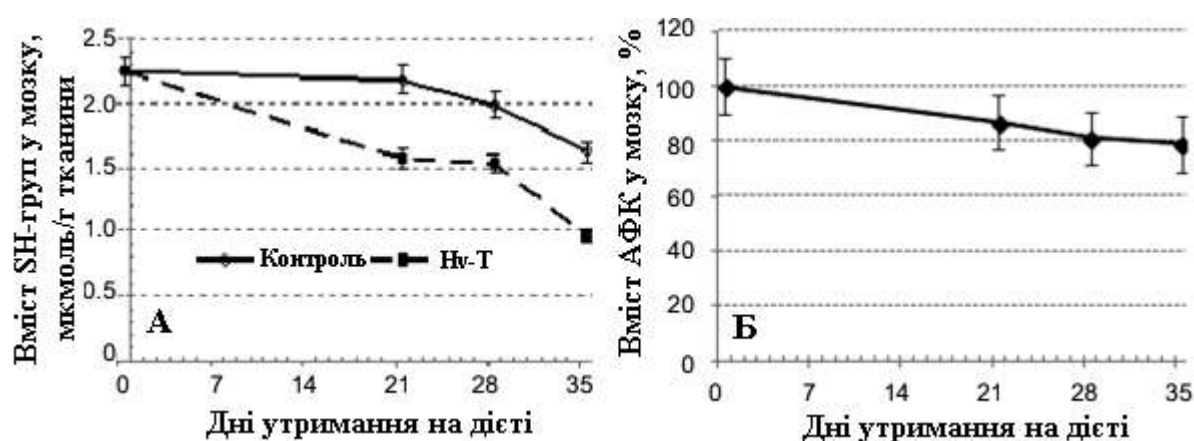


Рис. 3.7. Вміст SH-груп (А) та АФК (Б) в мозку щурів з моделлю аліментарного гіповітамінозу (Нv-Т) у динаміці розвитку патологічного стану. Дані представлено як $M \pm m$. (n=6-7).

На Рис. 3.7. представлено дані по динаміці зміни показників редокс стану тканини мозку за умов розвитку B_1 -гіповітамінозу. Результати демонструють, що також як і за умов Av-Т вміст SH-груп (фактично, глутатіону, який переважає у пулі низькомолекулярних тіолів (Kulinskiy & Kolesnichenko, n.d.) в мозку щурів групи Нv-Т є зниженим відповідно контролю на протязом всього терміну утримання їх на гіповітамінозній дієті (3.7, А). Рівень АФК, на відміну від моделі Av-Т, зменшується в мозку Нv-Т щурів після трьох тижнів дієти і продовжує поступово зменшуватися до кінця експерименту (рис.3.7 Б). Зменшення рівня АФК протягом експерименту у групі Нv-Т можна пояснити уповільненням окислювально-відновних реакцій у клітинах за цих умов. Можливо також, що кількості тіаміну, яка надходить в мозок за цих умов,

достатньо для нейтралізації надлишкового утворення вільних кисневих радикалів. Останнє припущення є цілком можливим, оскільки похідні тіаміну здатні взаємодіяти з такими структурами (I. M. Parkhomenko, Stepuro, et al., n.d.). Аналіз даних щодо оцінки Red-Ox балансу мозкової тканини щурів за умов Нv-Т, показав, що в стані повільного надходження до організму невеликої кількості тіаміну і зниження його рівня у тканинах (гіповітамінозу) відсутні очевидні ознаки окисного стресу в мозку, однак відновлювальні можливості організму пригнічуються у запропонованих умовах.

З метою перевірити, чи можливо відновити рівень SH-груп на фоні тривалого B₁-гіповітамінозу ми наприкінці експерименту вводили частині тварин тіамін у кількості 200 мкг/100 г і іншій частині препарат Метовітан у кількості 200 мкг/100 г. Слід зазначити, що в такій кількості препарату Метовітан міститься всього біля 0,6 мкг тіаміну гідрохлориду, але інші його компоненти сприяють активації процесів трансметилування і, відповідно, синтезу глутатіону.

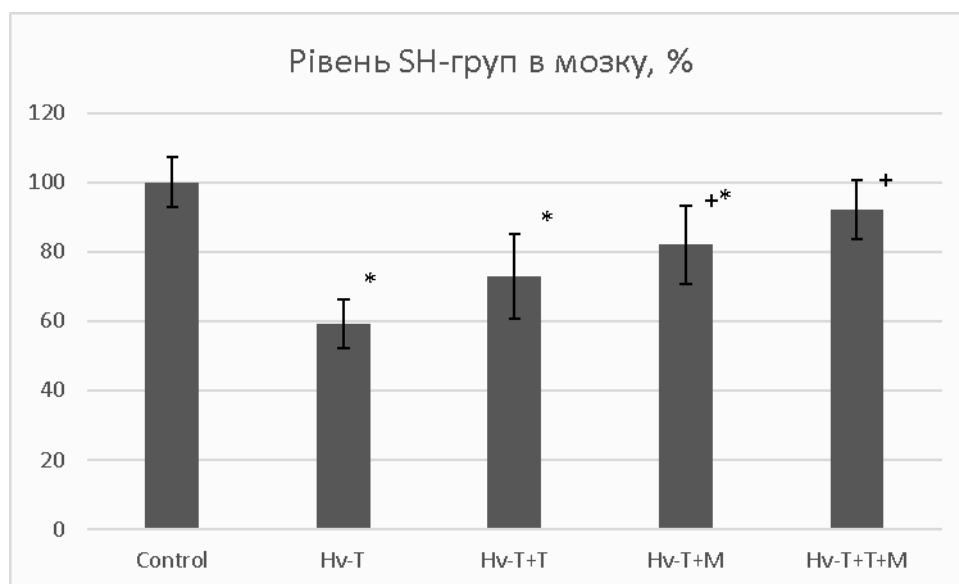


Рис. 3.8 Вміст вільних SH-груп у головному мозку щурів чотирьох експериментальних груп: контрольної (control), групи з аліментарним гіповітамінозом (Hv-T), групи з корекцією тіаміном (Hv-T+T), метовітаном (Hv-T+M) та сумісним (Hv-T+T+M); значення наведено у відсотках від контролю. * $P < 0.05$ у порівнянні з контролем, + $P < 0.05$ у порівнянні з Hv-T. Дані представлено як $M \pm m$. ($n=6-7$).

Результати наведені на Рис. 3.8 демонструють, що одноразове введення високої дози тіаміну незначно підвищує рівень сульфгідрильних груп в тканині мозку, але не забезпечує повного відновлення цього показника відносно контрольної групи. Проте сумісне введення препарату «Метовітан» з тіаміном повністю нормалізує цей показник.

3.1.3. Хронічний алкоголізм

Алкогольна енцефалопатія є однією з найпоширеніших нейродегенеративних патологій (R F Butterworth et al., 1991). Дефіцит вітаміну В₁ при довготривалому вживанні алкоголю є добре встановленим фактом і вважається однією з причин розвитку нейродегенеративного захворювання у людей, які страждають на хронічний алкоголізм. Синдром Верніке-Корсакова (C. Harper, n.d.; Hear et al., 2002; Leevu, 1982) – частий наслідок хронічного вживання алкоголю.

В наших досліджах використана модель хронічного алкоголізму на щурах. Останні вживали 15% водний розчин етанолу як єдине джерело рідини протягом 9 місяців. При вихідній середній вазі щурів 126 ± 8 г в кінці дослідження середня вага контрольних щурів перевищувала 550 г, в той час як щури дослідної групи відставали від контрольної по цьому показнику в середньому на 26%.

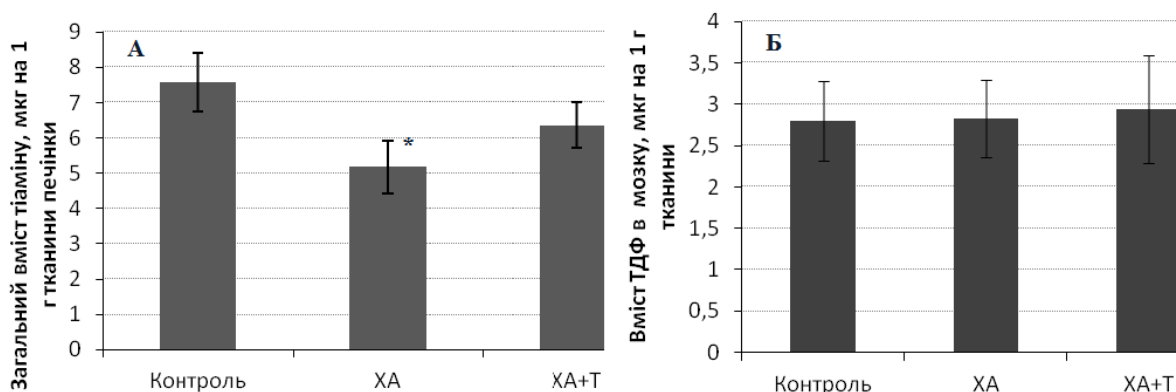


Рис. 3.9. Вміст тіаміну в печінці (А) та ТДФ (Б) в мозку щурів з моделлю хронічного алкоголізму (ХА) та за введення тіаміну (ХА+Т), Дані представлено як $M \pm m$. ($n=6-7$). * $P < 0.05$ у порівнянні з контролем.

За умов хронічного алкоголізму ми спостерігали зниження вмісту тіаміну у печінці у півтора рази (Рис. 3.9 А), однак зниження вмісту ТДФ у мозку не відбувалось (Рис. 3.9 Б).

Для оцінки Red-Ox балансу нервової тканини за умов хронічної етанолової інтоксикації ми дослідили зміни вмісту АФК та рівня вільних SH-груп у щурів з хронічним алкоголізмом та перевірили дієвість введення Метовітану разом з тіаміном для корекції Red-Ox змін патологічного стану.

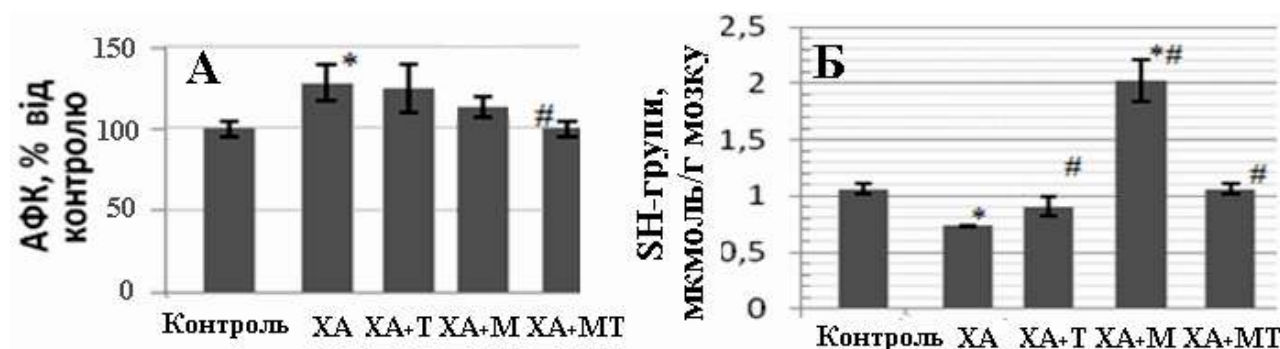


Рис 3.10. Рівень АФК та SH-груп в мозку щурів з моделлю хронічного алкоголізму (XA) та після одноразового введення тіаміну(XA+T), Метовітану (XA+M) або їх комбінації з Метовітаном (XA+T+M) , Дані представлено як $M \pm m$. ($n=6-7$). * $P < 0.05$ у порівнянні з контролем, + $P < 0.05$ у порівнянні з XA .

Дані демонструють, що на фоні хронічного алкоголізму достовірно підвищується рівень АФК та знижується рівень SH-груп в тканині мозку. Проте введення високої дози тіаміну нормалізує лише останній показник, в той час як рівень АФК повертається до норми при введенні разом з тіаміном препарату Метовітаном (рис. 3.10 Б), який ймовірно сприяє корекції Red-Ox стану тканини.

Узагальнюючи дані, можна зробити кілька висновків: по-перше за умов алкоголізму порушується Red-Ox баланс тканини мозку, що відбивається на підвищенні вмісту АФК та зниженні рівня сульфгідрильних груп. По-друге скорегувати патологічний стан введенням лише високих доз тіаміну не є можливим. Вочевидь препарат «Метовітан» активує обмін, та підсилює усі процеси метаболізму тіаміну, а також відновлює редокс-стан тканини.

3.2. THTR-1 ЗА УМОВ РІЗНОЇ ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ ОРГАНІЗМУ ТІАМІНОМ

Тіамін і фолати транспортуються до клітин підгрупою суперсімейства транспортерних протеїнів SLC, що отримало назву SLC19 (Ganapathy et al., 2004; Matherly & Goldman, 2003; Rodionov et al., 2009). До цього сімейства входить фолатний транспортер (RFC), транспортер тіаміну 1 (ThTr1), і транспортер тіаміну 2 (ThTr2) (Rajgopal, Edmondson, Goldman, & Zhao, 2001; Rongbao Zhao & Goldman, 2013). Центральною відмінністю між цими протеїнами є їх локалізація і функціональні можливості: SLC19A2 і SLC19A3 транспортують T^+ через клітинні мембрани; однак, вони не зв'язують фолати (T^+ несе позитивний заряд при фізіологічному рН, тоді як фолати несуть негативні заряди). ThTr1 локалізується в скелетних м'язах та нервовій тканині (Dutta et al., 1999), тоді як ThTr2 переважно експресується в кишечнику (Rongbao Zhao & Goldman, 2013). Їх афінність зв'язування тіаміну також різна, перший має константу K_m 2,5 мкМ, а другий працює в діапазоні 25 нМ, що показує, що ThTr2 має особливо високу специфічність для тіаміну для загального поглинання в кишечнику.

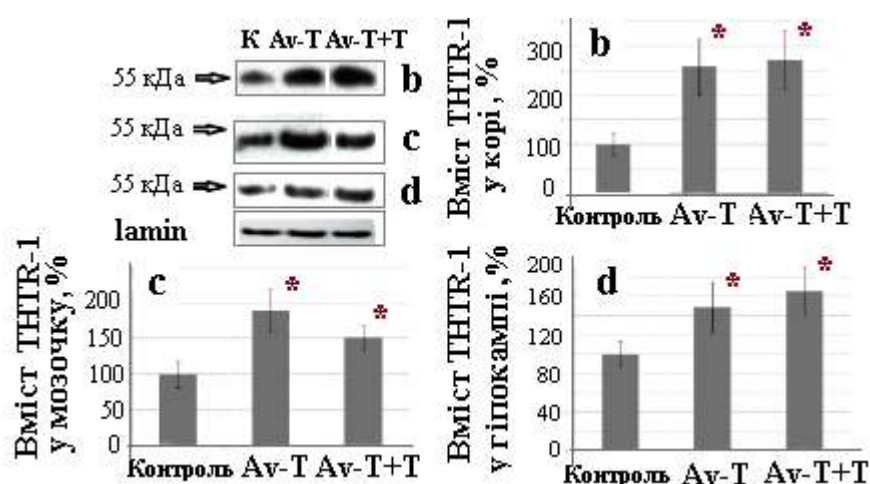
Оскільки нас цікавило дослідження стану транспортної системи тіаміну нервових клітин в умовах ТД різної етіології, об'єктом було обрано саме THTR-1. Відомо, що мутація гену транспортеру призводить до розвитку тіамін-чутливої мегалобластичної анемії, захворювання, що у деяких випадках закінчується летально. Наразі чіткого розуміння щодо змін у стані транспортеру за умов аліментарного дефіциту тіаміну, або патологій, що їм супроводжуються, немає. У 2013 р Klooster et al (Klooster et al., 2013) зробили повідомлення щодо підвищення експресії THTR-1 у мозку, серці, печінці та нирках на 20-25% від контрольного значення за умов гіповітамінозу. Також відомо, що вміст THTR-1 у клітинах печінки за умов гострого алкоголізму знижується майже вдвічі (Srinivasan, Subramanian, & Said, 2014). Однак регіональна селективність THTR-1 у головному мозку невідома та дані щодо дослідження змін вмісту THTR-1 у

нервовій тканині за умов нестачі тіаміну та можливості корекції патологічних порушень відсутні.

У цьому розділі ми дослідили *in vivo* зміни у вмісті та експресії THTR-1 шляхом імуноблотингу та ПЛР, відповідно, за умов аліментарного авітамінозу, гіповітамінозу та хронічного алкоголізму. Дослідження проводились у різних відділах головного мозку (корі великих півкуль, мозочку та гіпокампі) задля виявлення регіональної селективності і чутливості до ТД станів. Також ми досліджували можливість корекції виявлених змін у рівні транспортеру одноразовим введенням високої дози тіаміну, препарату «Метовітан» та їх комбінації у випадку хронічного алкоголізму.

3.3.1 Вміст та експресія THTR-1 у відділах головного мозку щурів за умов аліментарного авітамінозу.

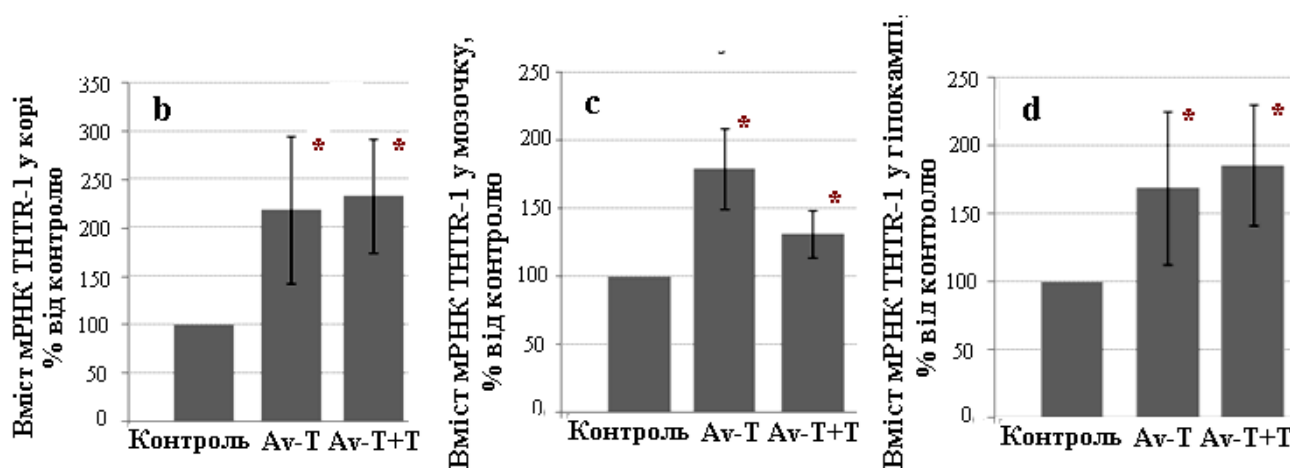
Оскільки у літературі дані щодо вмісту THTR-1 у головному мозку за умов глибокого Ав-Т відсутні, ми дослідили методом імуноблотингу зміни рівня THTR-1 у різних відділах головного мозку щурів та з'ясували, як вплине на ці зміни одноразове введення високої дози тіаміну (200 мкг) за добу до декапітації. Результати наведено на рис 3.11



Р и с. 3.11. Відносний вміст THTR-1 у відділах головного мозку тварин трьох експериментальних груп. Блотограма усіх відділів, вміст THTR-1 у корі великих півкуль (b), мозочку (c) та гіпокампі (d). Дані представлено як $M \pm m$. ($n=6-7$) $*P < 0.05$ у порівнянні з контролем.

Результати демонструють, що за умов глибокого Ав-Т відбувається зростання вмісту THTR-1 у всіх досліджуваних відділах, найбільш виразно у корі великих півкуль – у 2,5 рази у порівнянні з показником контрольної групи. Одноразове введення вітаміну за добу до декапітації не вплинуло на вміст протеїну у жодному з відділів (у всіх трьох структурах вміст транспортеру залишився підвищеним у порівнянні з контрольною групою).

Для того, щоб визначити, чи відбувається підвищення синтезу протеїну на рівні експресії, ми провели кількісну ПЛР зразків. Дослідження проводили з геном-референсом HPRT. Результати наведено на рис. 3.12.



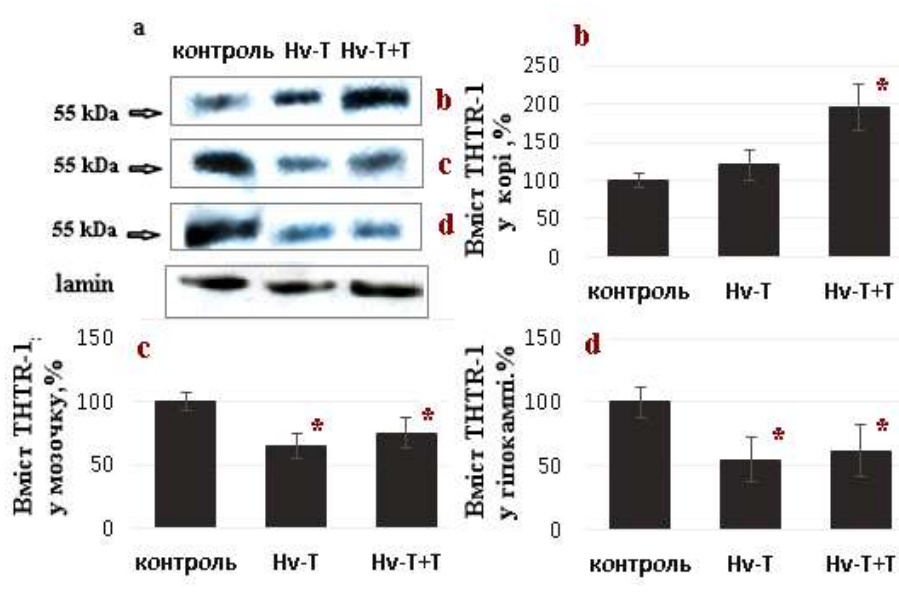
Р и с. 3.12. Відносний вміст м-РНК THTR-1 у відділах головного мозку тварин контролю, з авітамінозном (Ав-Т) та групи з введенням 200 мкг тіаміну за добу до декапітації (Ав-Т+Т). Зміни вмісту м-РНК THTR-1 у корі великих півкуль (b), мозочку (c) та гіпокампі (d), з референсом HPRT. Дані представлено як $M \pm m$. * $P < 0.05$ у порівнянні з контролем ($n=6-7$).

Дані ПЛР підтвердили картину, що спостерігається у результатах імуноблотінгу, та продемонстрували, що Ав-Т призводить до підвищення біосинтезу THTR-1 на рівні експресії у всіх відділах, найбільш виразно у корі великих півкуль (у 2,2 рази у порівнянні з контролем). При введенні тіаміну цей показник в корі і гіпокампі залишається на рівні Ав-Т групи і лише у мозочку, де, згідно даним літератури обмін тіаміну є найбільш інтенсивним (Rindi, Comincioli, Reggiani, & Patrini, 1987), спостерігається виражена тенденція до нормалізації рівня THTR-1. Таким чином, результати демонструють підвищення експресії THTR-1 у відповідь

на Av-T і одноразове введення щурам з Av-T тіаміну не сприяє швидкому поверненню показника до норми. Якщо ми повернемося до даних щодо вмісту ТДФ в мозку в групі Av-T + T (Рис. 3.2 Б), то цей показник також як і вміст протеїну THTR-1 не повертається до рівня контролю за умов одноразового введення тіаміну. На нашу думку, отримані у цій серії експериментів результати дають підстави припустити, що саме рівень ТДФ в клітинах може бути фактором, регулюючим експресію транспортера THTR-1.

3.2.2 Вміст THTR-1 у відділах головного мозку щурів за умов аліментарного гіповітамінозу.

Враховуючи повідомлення Klooster et al щодо підвищення експресії THTR-1 у загальному гомогенаті головного мозку щурів за умов гіповітамінозу (Klooster et al., 2013), ми вирішили перевірити, чи зміни у рівні THTR-1 відбуваються однаково по всіх відділах та чи можливо нормалізувати вміст THTR-1 за цих умов одноразовим введенням високої дози тіаміну (200 мкг) за добу до декапітації тварин. Було визначено відносний вміст транспортеру у корі великих півкуль, мозочку та гіпокампі методом Western-blot аналізу. Результати наведено на рис. 3.13.



Р и с. 3.13. Відносний вміст THTR-1 у відділах головного мозку тварин контролю, з гіповітамінозом (Hv-T) та групи з введенням 200 мкг тіаміну (Hv-T+T). Блотограма усіх відділів (а), вміст THTR-1 у корі великих півкуль (б), мозочку (в) та гіпокампі (г).

Дані представлено як $M \pm m$. ($n=6-7$) * $P < 0.05$ у порівнянні з контролем

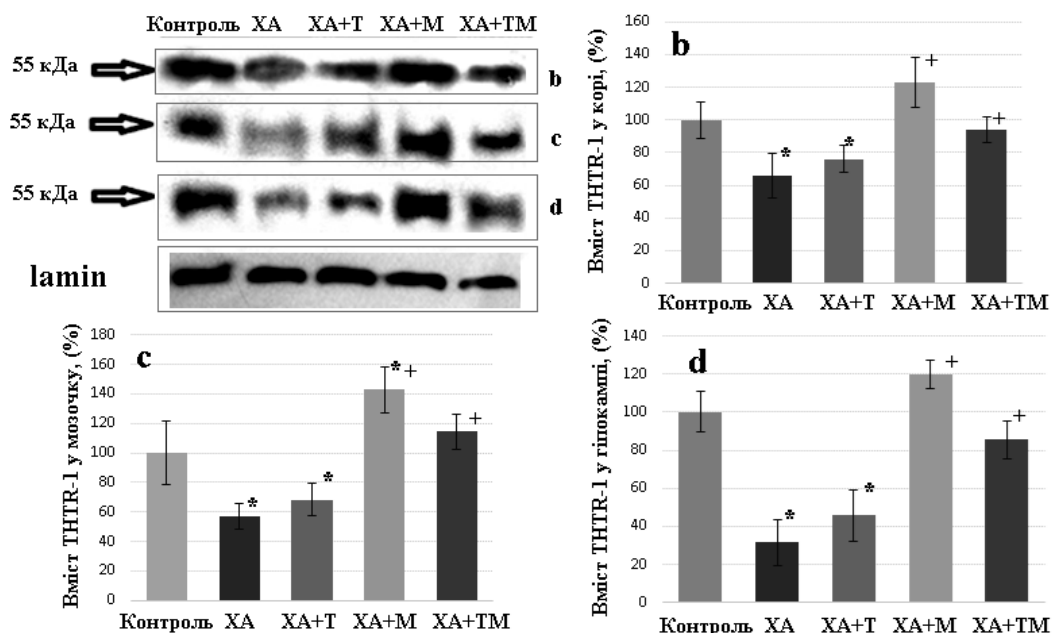
Вміст транспортера тіаміну, визначений по його імунореактивності в досліджуваних відділах мозку за умов Нv-T змінювався неоднаково: при дефіциті знижувався в мозочку і гіпокампі (в 1,5 і 2 рази відповідно), тоді як в корі великих півкуль рівень THTR-1 залишився на рівні контролю. При введенні тіаміну в корі спостерігалось різке збільшення імунореактивності THTR-1 майже в 2 рази відносно контрольної групи, тоді як у мозочку і гіпокампі показник у групі Нv-T+T не відрізнявся від групи з гіповітамінозом. Це може свідчити про більшу стійкість клітин кори великих півкуль до деструктивних змін, які можуть відбуватися при недостатньому надходженні тіаміну, що і забезпечує швидку реакцію клітини на введення тіаміну. Ймовірно, клітини мозочка і гіпокампа є більш вразливими до таких змін.

3.2.3 Вміст THTR-1 у відділах головного мозку щурів за умов хронічного алкоголізму.

Розвиток ТД на фоні алкоголізму призводить до хвороби Вернике-Корсакова – патологічного стану що характеризується атаксією, психозом та за відсутності лікування призводить до коми та летального закінчення. Відомо, що за умов алкогольної інтоксикації організму відбувається пригнічення транспорту тіаміну через епітелій кишечника, що є однією з причин розвитку ТД при хронічному споживанні алкоголю (Abdul-Muneer et al., 2018; Subramanya, Subramanian, & Said, 2010). Нещодавно було показано порушення транспорту тіаміну на ізольованих клітинах міокарда свиней за умов хронічної алкоголізації (Petrovic, Scerpanovic, Rosic, & Mitrovic, 2008). Однак повідомлень щодо досліджень стану транспортних систем тіаміну у ЦНС за умов розвитку алкоголізму наразі немає. І хоча тіамін широко використовується у комплексній терапії лікування наслідків алкоголізму, механізми впливу такої корекції на протеїни метаболізму тіаміну у нервовій тканині залишаються нез'ясованими.

Методом Western-blot аналізу ми дослідили зміни відносного вмісту THTR-1 за умов хронічної алкоголізації, та перевірили, чи можливо нівелювати ці зміни

одноразовим введенням високої дози тіаміну (200мкг/100 г маси тіла), препарату «Метовітан» (у разі розвитку оксидативного стресу) або їх комбінацією. Результати наведено на рис. 3.14



Р и с. 3.14. Відносний вміст THTR-1 у відділах головного мозку тварин контролю, алкогольної групи (ХА), групи з корекцією тіаміном (ХА+Т), групи з корекцією «Метовітаном» (ХА+М) та групи з комбінованою корекцією (ХА+Т+М). Блотограма усіх відділів, вміст THTR-1 у корі великих півкуль (b), мозочку (c) та гіпокампі (d). Дані представлено як $M \pm m$. ($n=6-7$). * $P < 0.05$ у порівнянні з контролем, + $P < 0.05$ у порівнянні з ХА.

Хронічне споживання алкоголю знижує рівень THTR-1 у всіх досліджуваних відділах у півтора - два рази по відношенню до показника контролю. Введення високої дози тіаміну жодним чином не вплинуло на рівень THTR-1, тоді як введення «Метовітану» призвело до різкого зростання показника у корі, мозочку та гіпокампі у 2,25, 3,3 та 3,6 разів відповідно. Комбінована корекція нормалізувала рівень THTR-1 у відділах, що може свідчити про те, що тіамін може використовуватись у якості корекції пошкоджень нервової тканини, спричинених алкогольною інтоксикацією тільки за умов сумісного введення препарату з вираженою антиоксидантною дією. Ймовірно, порушення Red-Ox балансу може блокувати нормалізацію рівня THTR-1 при введенні тіаміну.

Результати даного розділу продемонстрували зміни вмісту THTR тіаміну за умов дефіцитних станів різного ступеня важкості та різної етіології. За умов аліментарного ТД можна бачити дію компенсаторного механізму, що виражається у посиленні синтезу транспортеру. Також результати експерименту демонструють, що найбільш чутливою ділянкою мозку за рівнем транспортеру за умов аліментарної нестачі вітаміну є кора великих півкуль: вона демонструвала найбільш виразне підвищення рівня THTR-1, що може свідчити про пріоритетність кори при відновленні нормального функціонування метаболізму тіаміну у нервовій тканині. За умов тривалої дії алкоголю (дев'ять місяців вживання 15% розчину етанолу) рівень THTR-1 у відділах мозку знижується у порівнянні з відповідним показником контрольної групи. Введення одного лише тіаміну не призвело до нормалізації рівня THTR-1 за вказаних умов. Однак у випадку сумісного введення тіаміну з препаратом «Метовітан», що має виразну антиоксидантну дію, показник нормалізується до рівня контролю, також як і рівень АФК в мозку за цих же умов (Рис. 3.10).

В окремій серії експериментів ми дослідили зв'язування міченого тіаміну з синаптосомами клітин, ізольованими із мозку щурів нормальних і з моделлю хронічного алкоголізму. Ми використали в досліді чотири зростаючі концентрації міченого тіаміну як субстрату. Дані наведено на Рис. 3.15.

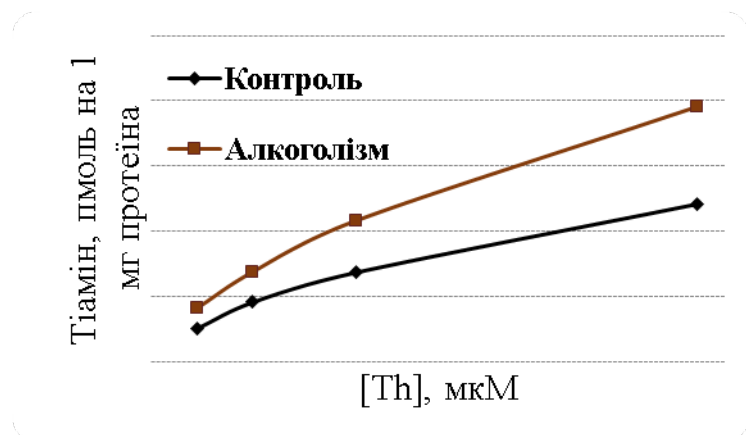


Рис. 3. 15 Зв'язування тіаміну синаптосомами мозку нормальних щурів (1) та щурів з моделлю хронічної алкогольної залежності (2).

Дані, наведені на Рис. 3.15 свідчать, що кількість тіаміну, що зв'язується з синаптосомами, ізольованими із мозку щурів з хронічним алкоголізмом є вищим

ніж цей показник для контрольних щурів. Отримані дані свідчать про зниження афінності тіаміну до синапсом за умов хронічної дії алкоголю.

Однак вміст транспортера тіаміну - THTR-1 і, ймовірно, його експресія знижені за умов ХА. Залишається припустити, що надходження тіаміну в нервові клітини за умов хронічної дії алкоголю може прискорюватися з залученням інших крім THTR-1 транспортних протеїнів або механізмів.

3.3. Вміст, експресія та активність ТПК в мозку щурів за умов різної забезпеченості організму тіаміном.

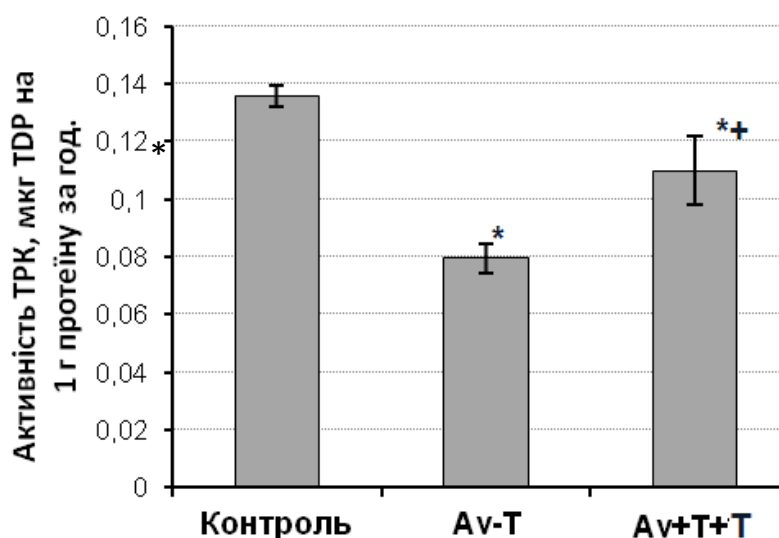
Відповідно до сучасних уявлень, ТПК є єдиним ензимом, відповідальним за синтез ТДФ із вільного тіаміну, який надходить в клітини ззовні, і, згідно даних літератури, він локалізований в цитоплазмі (Brown, 2014; Nosaka et al., 2001). Враховуючи ідею щодо циркулюючого пулу тіаміну в нервових клітинах (Pavlova et al., 2016), однією з ключових ланок котрого є ТПК, ми вважаємо надважливим детальне дослідження цього ензиму як за умов норми, так і розвитку патологічних станів, викликаних ТД. Вважають, що ТПК може асоціюватись з внутрішньою стороною плазматичних мембран, приймаючи до уваги відомості що транспорт і фосфорилування тіаміну тісно пов'язані в часі (Petrovic et al., 2008). Механізми регуляції активності згаданого ензиму вивчені недостатньо; зокрема, чіткі уявлення про те, які зміни можуть відбуватися з цим ензимом при хронічній нестачі тіаміну в організмі і чи зберігає він здатність відновлювати функціональність та рівень при раптовому підвищенні вмісту тіаміну, поки відсутні. Також невідомо, чи ці зміни відбуваються однаково у різних відділах мозку. Згідно з існуючими даними літератури, інтенсивність обміну тіаміну і, відповідно, реакція на недостатність даного вітаміну в організмі в різних відділах головного мозку неоднакові (Laforenza et al., 1990). Найактивнішою структурою в аспекті метаболізму тіаміну і його похідних вважається мозочок. Зокрема, в цій області головного мозку були виявлені найвища активність ТПК (у два рази вище за аналогічний показник в гіпокампі) (Matsuda, Yabushita, Doi, & Iwata, 1985), найвища швидкість обміну тіаміну (Rindi et al., 1987), а також найвищий діапазон коливань активності піруватдегідрогеназного комплексу при переході ензиму активна-неактивна форма (Rozanov & Parkhomenko, n.d.). Кора великих півкуль, мабуть, більш стійка до порушень обміну тіаміну, ніж мозочок; в корі більш-менш адекватний рівень метаболізму зазначеного вітаміну в нормі зберігається при ТД довше (Patrini, Nauti, & Rindi, 1998).

У цьому розділі було досліджено зміни у параметрах стану ТПК *in vivo* за умов аліментарних а- та гіпо-вітамінозів і хронічного алкоголізму та при одноразовому введенні на цьому фоні високої дози тіаміну.

Ми аналізували активність ТПК в гомогенатах мозку експериментальних тварин, оцінювали рівень цього протеїну в декількох відділах мозку з використанням методики імуноблотинга та експресію гену ТПК-1 методом кількісної ПЛР у реальному часі. Також було досліджено зміни локалізації та вмісту ензиму на культурі клітин мишачої нейробластоми за нестачі тіаміну та його введення.

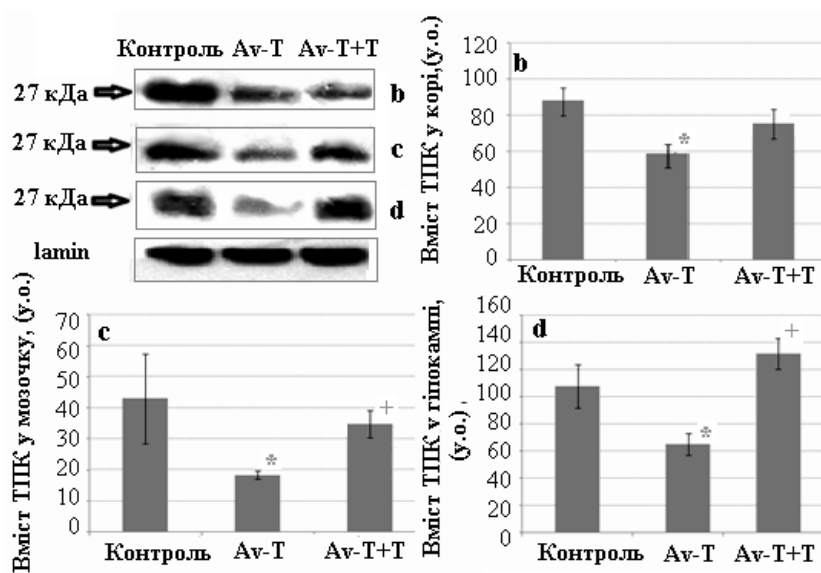
3.3.1 Вміст, експресія та активність ТПК за умов аліментарного авітамінозу.

Аналіз активності ТПК в гомогенаті тканини цілого мозку щурів в групі Ав-Т (рис. 3.16) показав різке зниження цього показника (у 1.7 разів у порівнянні з контролем) і наближенні його до контрольного значення після введення тваринам з Ав-Т за добу до декапитації 2.0 мг / кг тіаміну.



Р и с. 3.16 Середні значення активності тіамінпірофосфокінази (нмоль тіаміндифосфату/мг протеїну · год) у тканині мозку тварин трьох експериментальних груп. Дані представлено як $M \pm m$. ($n=6-7$) * $P < 0.05$ у порівнянні з контролем, + $P < 0.05$ у порівнянні з Ав-Т .

Оскільки раніше в літературі були повідомлення щодо неоднорідної реакції відділів мозку на нестачу тіаміну (Bâ, 2011; Kattah, Tehrani, du Lac, Newman-Toker, & Zee, 2018; Laforenza et al., 1990; I. M. Parkhomenko, Stepuro, et al., n.d.), то окрім активності ТПК в загальному гомогенаті, нас цікавили зміни вмісту ензиму у мозочку, корі великих півкуль та гіпокампі. Шляхом імуноблотингу ми дослідили вміст ТПК в зазначених відділах мозку щурів всіх дослідних груп, а саме, контрольній, Ав-Т та у групі щурів, яким на фоні Ав-Т було введено 200 мкг тіаміну за добу до термінації експерименту. Результати наведені на рисунку 3.17.

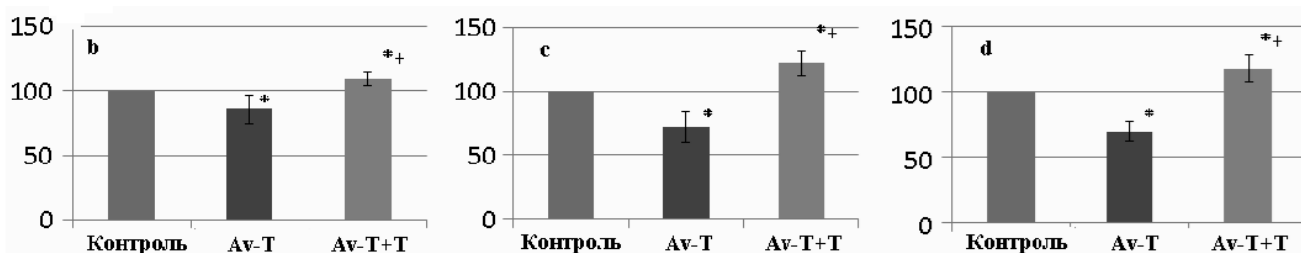


Р и с. 3.17. Відносний вміст ТПК у відділах головного мозку тварин контролю, з аліментарним авітамінозом (Ав-Т) та групи з корекцією (Ав-Т +Т). Блютограма та вміст ТПК у корі великих півкуль (b), мозочку (c) та гіпокампі (d). Дані представлено як $M \pm m$. ($n=6-7$) $*P < 0.05$ у порівнянні з контролем, $+P < 0.05$ у порівнянні з Ав-Т.

Отримані нами дані показали, що в умовах глибокого аліментарного ТД вміст ТПК достовірно знижувався у всіх досліджуваних відділах: в корі приблизно на 35%, в мозочку – більш, ніж вдвічі, а в гіпокампі - на 40% відносно контролю ($P < 0.05$). Одноразове введення тіаміну у кількості 200 мкг/100 г ваги призводило до суттєвого зростання рівня цього показника відносно групи Ав-Т в мозочку і гіпокампі (на 170 і 200% відповідно). Але в корі великих півкуль відновлення вмісту протеїну ТПК за вказаних умов не відбулося, спостерігається лише тенденція до підвищення, що, можливо, є наслідком повільнішого обміну тіаміну в цій структурі, ніж в мозочку і гіпокампі.

Для того, щоб визначити, чи означені зміни у кількості протеїну відбуваються на рівні експресії, було проведено ПЛР у реальному часі з визначенням кількості

мРНК ТПК-1. У якості гену референту використовували HPRT (гіпоксантин-гуанінфосфорибозилтрансфераза). Результати (рис. 3.18) виявили зниження експресії гену ТПК в групі Ав-Т у корі і мозочку, а у гіпокампі це зниження було найбільш виразним. Одноразове введення тіаміну призвело до зростання показнику у всіх трьох відділах, найбільш виразно – у мозочку.



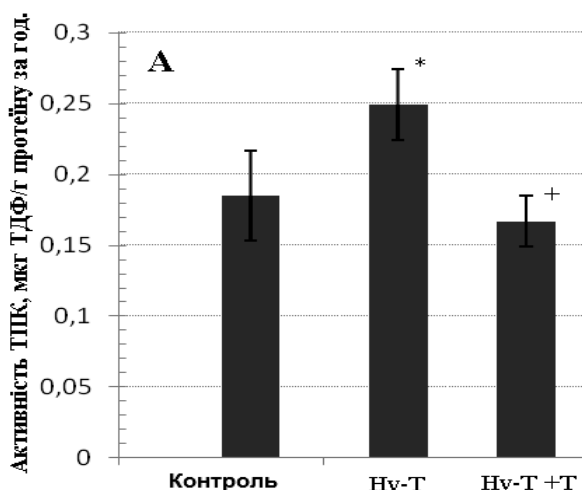
Р и с. 3.18. Відносний вміст м-РНК ТПК-1 у відділах головного мозку тварин контролю, з аліментарним авітамінозом (Ав-Т) та групи з корекцією (Ав-Т +Т). Вміст м-РНК ТПК-1 у корі великих півкуль (b), мозочку (c) та гіпокампі (d), з референсним геном HPRT. Дані представлено як $M \pm m$. ($n=6-7$) $*P < 0.05$ у порівнянні з контролем, $+P < 0.05$ у порівнянні з Ав-Т.

Таким чином, дослідження стану ТПК за умов Ав-Т та за введенні тіаміну на цьому фоні показало суттєві зміни як активності ензиму у загальному гомогенаті мозку так і вмісту ТПК у різних його відділах. Ймовірно, що первинною причиною цих змін є однонаправлені зміни в експресії гену ТПК і рівень тіаміну або ТДФ у клітинах якимось чином впливає на цей процес. Більш виражене зниження за умов Ав-Т рівня протеїну ТПК порівняно із зниженням рівня мРНК ТПК можна пояснити активацією протеоліза апоензиму ТПК при відсутності коензиму, або певними посттрансляційними модифікаціями цього протеїну за умов Ав-Т, що знижують його активність і імунореактивність. В той же час введення тіаміну призводить до активації експресії гену ТПК-1 у всіх досліджуваних відділах що відбивається на підвищенні вмісту протеїну.

3.3.2 Вміст та активність ТПК за умов аліментарного гіповітамінозу

Найбільш поширеною ситуацією щодо забезпеченості вітамінами, зокрема тіаміном, організму сучасної людини, навіть у розвинених країнах, є стан

аліментарного гіповітамінозу. Причиною цього частіше за все є хронічне недоотримання добової норми вітамінів з їжею внаслідок незбалансованої за вітамінами дієти, неякісних харчових продуктів та інших факторів. Саме для того щоб наблизитися до розуміння реальної ситуації ми створили на щурах модель B_1 гіповітамінозу і дослідили як хронічне недостатнє надходження тіаміну до організму відображається на стані ТПК мозку щурів протягом розвитку гіповітамінозу. Дослідження активності ТПК у гомогенаті мозку Hv-T щурів показало, що за умов гіповітамінозного стану активність ензиму зростає у 1,7 раз відносно контрольної групи, тоді як введення тіаміну нормалізує цей показник до рівня контролю (рис. 3.19).

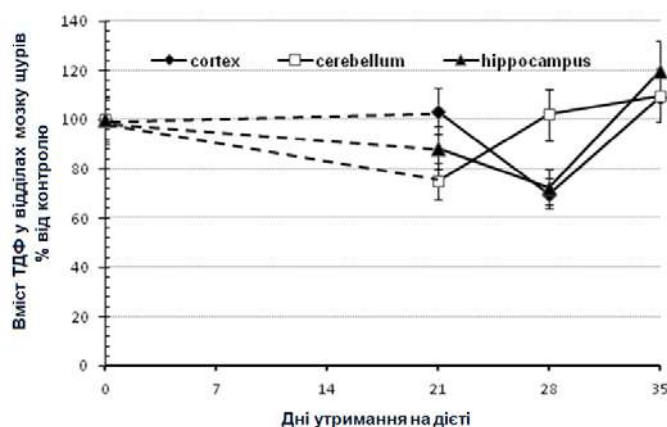


Р и с. 3.19. Середні значення активності ТПК (нмоль ТДФ/мг протеїну · год) у тканині мозку тварин трьох експериментальних груп: контролю, гіповітамінозу (Hv-T) та групи з корекцією (Hv-T + T).

Дані представлено як $M \pm m$. ($n=6-7$) * $P < 0.05$ у порівнянні з контролем, + $P < 0.05$ у порівнянні з Hv-T.

Оскільки цей результат виявився досить несподіваним, ми вирішили детальніше дослідити зміни активності ензиму і вмісту ТДФ у різних відділах головного мозку в процесі розвитку гіповітамінозу на 21й, 28й та 35й день розвитку Hv-T. Результати наведено на Рис 3.20 та 3.21.

Рис. 3.20 Вміст ТДФ у відділах мозку (корі великих півкуль, гіпокампі та мозочку) щурів з Hv-T, у% від того ж показника для контролю Дані представлено як $M \pm m$. ($n = 6-7$).



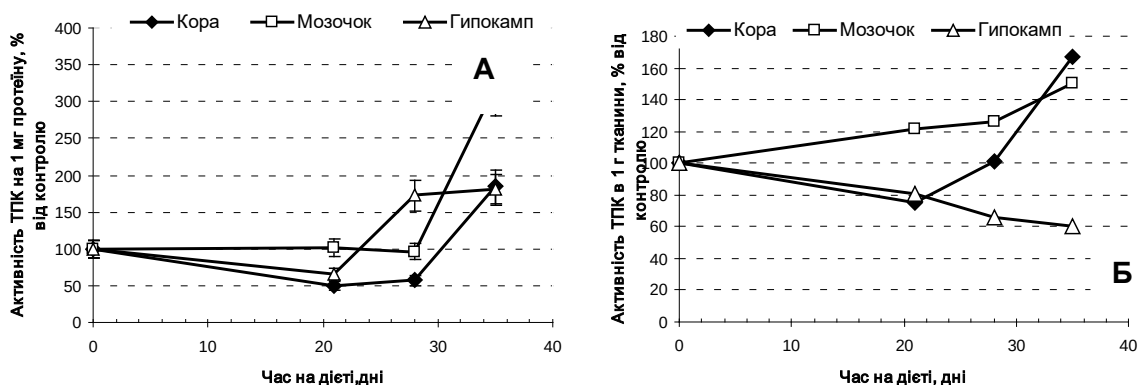


Рис 3.21 Активність ТПК в розрахунку на 1 мг протеїну (А) та на 1 г тканини (Б , розрахована величина) у відділах мозку (корі великих півкуль, гіпокампі та мозочку) щурів з Нv-Т у % від значення показника для парного контролю. Дані представлено як $M \pm m$. ($n=6-7$).

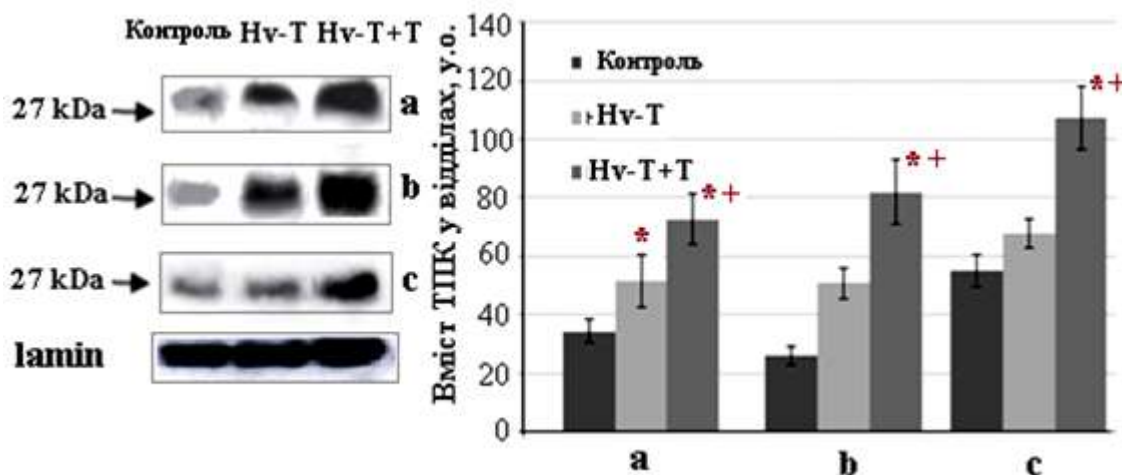
Дані, наведені на рисунках 3.20 та 3.21, з певним наближенням показують, що існує зворотна кореляція між активністю ТПК та вмістом ТДФ в корі та мозочку (з деяким відставанням у активності ТПК). Тобто збільшення активності ТПК у відділах головного мозку спостерігалось лише після попереднього зменшення концентрації ТДФ до певного рівня, і цей процес ймовірно, супроводжувався збільшенням продукції ТДФ. На рисунку 3.21 показані дані щодо активності ТПК на 1 мг протеїну для кожної частини мозку, тому можна побачити, що здатність ділянок мозку синтезувати ТДФ в динаміці розвитку Нv-Т не однакова для кори великих півкуль, гіпокампу та мозочку і вона відчутно підвищується наприкінці експерименту в корі та мозочку.

Щоб визначити, чи збільшується активність ТПК через збільшення кількості ензиму (на рівні експресії) або регулювання активності ТПК відбувається без зміни кількості протеїну за рахунок посттрансляційної модифікації, ми перевірили імунореактивність ензиму в кінці Нv-Т експерименту шляхом Western blot аналізу з використанням антитіл проти ТПК 1.

Дані, показані на Рис. 3.23, відображають підвищення рівня імунореактивності ТПК у всіх ділянках мозку на пізніх стадіях Нv-Т. Враховуючи, що нормалізація зразків при виконанні електрофорезу в Western blot аналізі відбувалася саме по протеїну, а визначена у цілісному мозку активність ТПК, розрахована на 1 мг

протеїну, також зростає у групах Нv-Т та Нv-Т + Т (Рис. 3.23.) можна заключити, що це зростання відбувається за рахунок збільшення експресії гену ТПК-1.

Виходячи з цих даних, можна припустити, що ТДФ, як продукт реакції, якимось чином бере участь у регуляції експресії ТПК в нервових клітинах



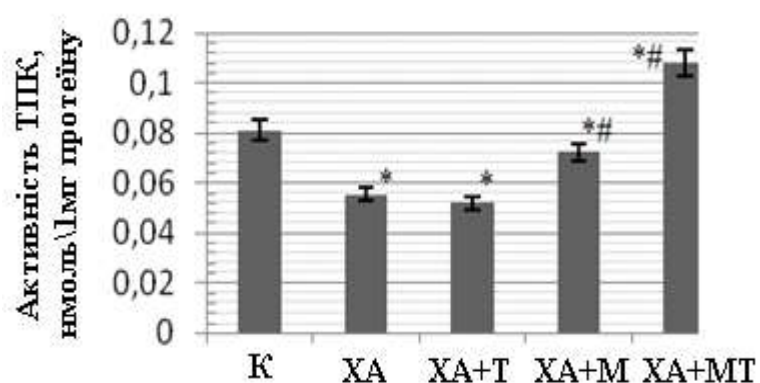
Р и с. 3.23. Відносний вміст ТПК у відділах головного мозку тварин контролю, з гіповітамінозом (Hv-Т) та з введенням тіаміну (Hv-Т+Т) наприкінці експерименту: блотограма та вміст ТПК у корі великих півкуль (а), мозочку (b) та гіпокампі (с). Дані представлено як $M \pm m$. ($n=6-7$) * $P < 0.05$ у порівнянні з контролем, + $P < 0.05$ у порівнянні з Hv-Т.

3.3.3 Вміст та активність ТПК за умов хронічного алкоголізму

Дані щодо впливу етанолу на біохімічні процеси, які беруть участь в обміні та функціонуванні тіаміну в нервових клітинах, доволі обмежені. Експериментально встановлено, що під впливом хронічного споживання алкоголю знижується активність ТПК (Cecanti et al., n.d.; Laforenza et al., 1990). Оскільки, згідно даних літератури, за умов хронічного алкоголізму розвивається окисний стрес (Yulia M Parkhomenko et al., 2011; Vidhya, Renjugopal, & Indira, n.d.), у якості корекції, окрім тіаміну, ми використали препарат «Метовітан» котрий має потужну антиоксидантну дію (Anisimova, Donchenko, Parkhomenko, & Kovalenko, n.d.) та комбіноване введення «Метовітану» з високою дозою тіаміну (200 мкг/100 г ваги). Враховуючи вищезначене, ми мали на меті встановити, як саме

змінюється рівень та активність ТПК у різних відділах мозку щурів (кора великих півкуль, гіпокамп і мозочок) за тривалого споживання етанолу, та чи є ці зміни зворотніми, тобто чи можна відновити їх до нормального значення, хоча б тимчасово, нормалізувавши редокс стан у клітинах введенням високих доз тіаміну і «Метовітану».

Насамперед ми дослідили зміни в активності ензиму цілісного мозку за умов хронічного алкоголізму та трьох варіантів корекції. Результати наведено на Рис. 3.24.



Р и с. 3.24. Активність ТПК (нмоль ТДФ/мг протеїну · год) у тканині мозку тварин наступних груп: контроль (К), хронічний алкоголізм (ХА), ХА + Т, ХА + Метовітан (ХА+М) ХА+МТ. Дані представлено як $M \pm m$. ($n=6-7$) * $P < 0.05$ у порівнянні з контролем, # $P < 0.05$ у порівнянні з

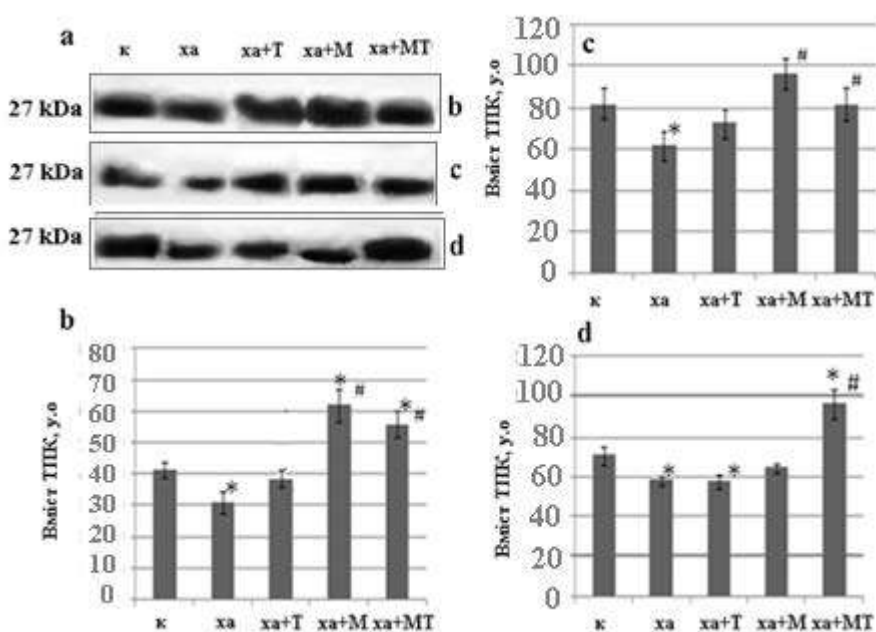
ХА.

У щурів, що вживали алкоголь, спостерігалось зниження активності ТПК у 1,6 разів відносно контрольної групи. За введення тіаміну не відбулося жодної зміни показника, він залишився на рівні алкогольної групи. Однак в групі з корекцією Метовітаном активність ТПК майже досягала рівню контролю. Сумісне введення препаратів призвело не тільки до повної нормалізації активності ензиму, але і до підвищення його вмісту більш ніж на третину відповідно значення у контролі (рис. 3.18). Це свідчить про те, що окисний стрес може якимось чином впливати на статус ТПК у клітинах. Висновок підтверджується тим фактом, що нормалізація окисно-відновного стану у клітинах введенням препарату «Метовітан» призводить до нормалізації і параметрів стану ТПК. За нашим припущенням, одним із ймовірних посередників впливу порушення Red-Ox балансу на стан ТПК може бути окислена форма ТДФ, яка накопичується за цих

умов (І. М. Parkhomenko, Pilipchuk, et al., n.d.) і може втручатися в експресію або функціонування ТПК. Принаймні, це питання заслуговує на подальше дослідження.

Аналіз вмісту ТПК у корі великих півкуль, мозочку та гіпокампі за умов хронічного алкоголізму та трьох варіантів коригування проводили шляхом вестерн-блот аналізу.

За результатами імуноблотингу (рис. 3.25) було виявлено, що за хронічного алкоголізму відбувається зниження рівню ТПК у всіх трьох досліджуваних відділах (корі великих півкуль, гіпокампі та мозочку) на 20-25% відносно контрольної групи. На корекцію відділи відреагували по-різному: введення самого лише тіаміну сприяло відновленню вмісту ТПК у корі до контрольного рівню, та зростанню показнику у мозочку. Однак у гіпокампі введення тіаміну у якості корекції не мало жодного ефекту. Корегування Метовітаном призводило до зростання рівню ензиму у всіх відділах, найбільш виразно у мозочку – більш ніж у два рази у порівнянні з групою без корекції. Комбіноване введення тіаміну та Метовітану відновлювало до контрольного рівень ТПК у корі, та значно підвищувало його у мозочку та гіпокампі (у обох відділах у 1,4 рази по відношенню до контролю) (Рис. 3.25).



Р и с. 3.25. Відносний вміст ТПК у відділах головного мозку тварин контролю (К), алкогольної групи (ХА), групи з корекцією тіаміном (ХА+Т), групи з корекцією «Метовітаном» (ХА+М) та групи з комбінованою корекцією (ХА+МТ). Блотограма усіх відділів (а) та вміст ТПК у корі (b),

мозочку (с) та гіпокампі (d). Дані представлено як $M \pm m$. ($n=6-7$) $*P < 0.05$ у порівнянні з контролем, $\#P < 0.05$ у порівнянні з ХА.

Хронічна алкогольна інтоксикація пригнічує біосинтез ТПК та знижує активність ензиму. Ми припускаємо, що це пригнічення стає результатом синергічної негативної дії ТД та ознак окисного стресу, що супроводжує патологічний стан. Це підтверджує відповідь організму на різні варіанти корекції: найбільш виразну нормалізуючу дію і на активність і на вміст ензиму мала комбінація препаратів – тоді як введення лише тіаміну не мало коригувального ефекту в жодному з досліджуваних відділів.

3.3.4. Локалізація ТПК за умов ТД та його корекції на культурі клітин мишачої нейробластоми.

Спряження транспорту тіаміну через плазматичну мембрану у клітину і його фосфорилування до ТДФ клітинною тіамінпірофосфокіназою тривалий час були предметом дискусії. Оскільки ці два процеси відбуваються майже одночасно, то були підстави припускати що ТПК локалізується у плазматичній мембрані. Тривалі експериментальні дослідження дозволили встановити, що практично у всіх клітинах живих тканин ТПК локалізована у цитоплазмі (Deus & Blum, 1970; Воскобоев, 1987).

Припущення про те, що ензим, відповідальний за синтез ТДФ у клітинах, може бути більш-менш асоційованим з плазматичною мембраною і ступінь цієї асоціації може бути одним із факторів регуляції його активності за певних умов, виникло на підставі експериментальних спостережень. В дослідях на щурах з хронічним алкоголізмом було отримано результати, котрі демонстрували, що зміни в активності ТПК таких щурів відносно контролю були неоднакові в залежності від того, визначалась активність в цільному гомогенаті мозку чи в цитозольній фракції гомогенату, відокремленої від мембран (Yulia M Parkhomenko et al., 2011). Це спостереження навело на припущення про

можливість зміни локалізації ТПК у клітині за умов розвитку тіаміндефіцитних станів, а саме збільшення асоціації ТПК з мембраною клітини за цих умов.

В даному дослідженні з метою перевірити, чи можливі такі зміни у локалізації ТПК за умов ТД, ми провели досліди на культурі клітин мишачої нейробластоми. Клітини культивувалися в нормальному та тіамін-дефіцитному (TD) середовищі, до частини клітин в TD середовищі за добу до закінчення інкубації ми додавали тіамін у концентрації 50 μM (TD+T). По закінченні культивування ми дослідили методом імуноцитохімії імунореактивність та локалізацію ТПК у клітинах, що утримувались за різних умов. Результати наведено на рис. 3.26

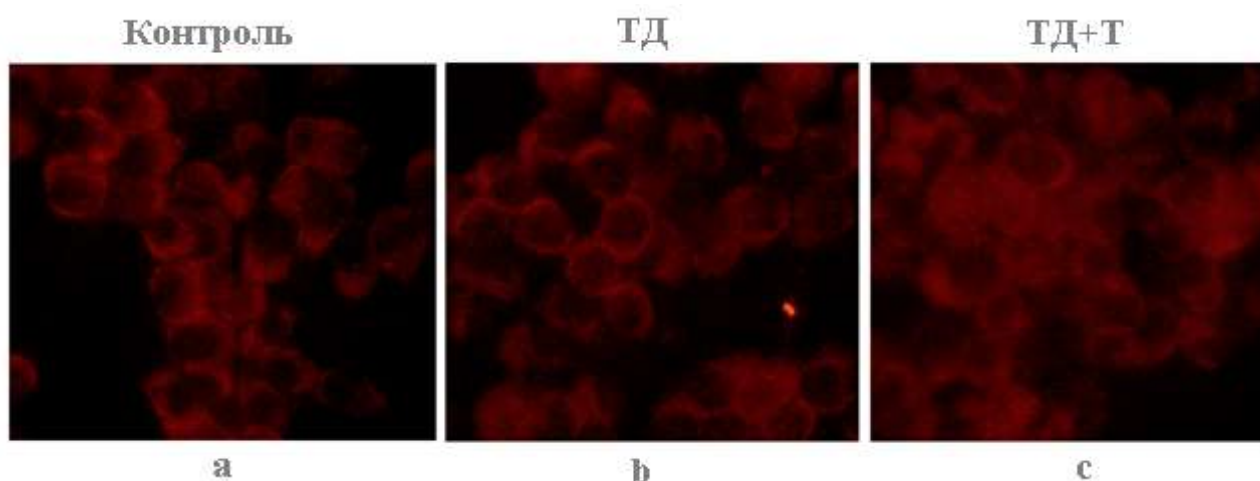


Рис. 3.26 Імуноцитограмми ТПК (червоний) на культурі клітин мишачої нейробластоми: контрольні клітини (а), клітини, культивовані на тіамін-дефіцитному середовищі (б) та клітини, культивовані на тіамін-дефіцитному середовищі з додаванням тіаміну за добу до термінації (в).

З результатів (рис. 3.26) видно, що за умов ТД забарвлення є більш ущільненим біля клітинної мембрани, що, дійсно, може бути наслідком певних змін в клітинних структурах, які ведуть до часткової зміни клітинної локалізації ТПК, а саме, збільшення її асоціації з плазматичною мембраною. З рисунка можна бачити, що введення високої дози тіаміну до ТД клітин призводить до рівномірного перерозподілу забарвлення у клітині. Зокрема, ці зміни в локалізації ТПК можуть бути одним із факторів, що сприяє підтриманню відносно постійного рівня ТДФ в клітинах мозку за умов дефіциту тіаміну.

3.4. ВМІСТ НЕЙРОСПЕЦИФІЧНИХ ПРОТЕЇНІВ ЦИТОСКЕЛЕТУ ЗА УМОВ РІЗНОЇ ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ ОРГАНІЗМУ ТІАМІНОМ ТА КОРИГУВАННЯ ДЕФІЦИТНОГО СТАНУ.

Значення вітаміну B₁ (тіаміну) в метаболізмі глюкози, нейротрансмісії та неврологічної функції в ЦНС добре відоме (Bâ, 2008; Enomoto & Edwards, 1985). Хоча всі типи клітин використовують тіамін, нервова система особливо чутлива до дефіциту тіаміну, що пов'язується з порушенням окисного метаболізму, зміненою функцією нейрона, порушенням гематоенцефалічного бар'єру, дисфункцією астроцитів, відкладенням амілоїду та запаленням (Ke, DeGiorgio, Volpe, & Gibson, 2003; Pácal, Kuricová, & Kaňková, 2014). Дефіцит тіаміну пов'язаний з синдромом Верніке-Корсакова, хворобою Альцгеймера, аміотрофічним бічним склерозом, хворобою Паркінсона, розсіяним склерозом і діабетом (Becker, Furman, Panisset, & Smith, 1990; Jhala & Hazell, 2011), які відповідають на лікування тіаміном або його похідними. Крім того, у дослідженнях на тваринах встановлено зв'язок між дефіцитом тіаміну та активацією мікроглії (Ji et al., 2014; D. Wang & Hazell, 2010). Також нещодавно було продемонстровано, що дефіцит тіаміну порушує нормальний зв'язок між рівнями синапсина I і фосфорильованим синапсином I гіпокампа та гіпокамп-залежною поведінкою. Ці дані поширюють попередні знахідки, які свідчать про залучення дисфункції нейротрансмісії гіпокампа в порушення просторового орієнтування і дефіцит пам'яті у щурів з пірітіамін-індукованим ТД (Resende, Ribeiro, Werner, Hall, & Savage, 2012). Враховуючи припущення щодо існування лабільного пулу тіаміну та його похідних в нервових клітинах, ми вважаємо за необхідне дослідити взаємозв'язок рівня забезпеченості організму вітаміном з функціонуванням рухомих структур клітин – насамперед, протеїнів цитоскелету. Оскільки головним об'єктом наших досліджень є мозок, нас у першу чергу цікавив взаємозв'язок ТД станів з функціонуванням нейроспецифічних протеїнів цитоскелету. Гліальні клітини (астроцити, олігодендроцити і мікроглія) це найбільш поширена клітинна група в центральній нервовій системі (Sherwood et

al., 2006). Астроцити часто ідентифікують за експресією цитоскелетного протеїну Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) та є найбільш численним клітинним типом сімейства глії (Yang et al., 2011). Стан нейронів характеризують за рівнем триплету нейрофіламентів (NF), що входять до складу нейронального цитоскелету (Yuan, Rao, Veeranna, & Nixon, 2017).

У цьому розділі було досліджено зміни рівня актину GFAP та NF у різних відділах головного мозку за умов Av-T, Hv-T та хронічного алкоголізму методами Вестерн-блот аналізу та імуноцитохімії. Також було перевірено можливість корекції виявлених змін одноразовим введенням високої дози тіаміну, препарату «Метовітан» та їх комбінації.

3.4.1 Актин за умов дефіциту тіаміну.

Оскільки одним із пунктів висунутої нами гіпотези щодо нейротропності тіаміну є уявлення про спряження обміну тіаміну із функціонуванням цитоскелету нервових клітин, ми провели також дослідження впливу забезпеченості організму щурів тіаміном на вміст актину. Незважаючи на те, що актин вважається одним зі стабільних протеїнів, що не має тканинної специфічності, останнім часом з'являються повідомлення, які свідчать, що не завжди актин при проведенні Вестерн-блотингу можна розглядати як протеїн порівняння [Eaton S.L., Roche S.L., 2013] а також що дефіцит тіаміну в організмі може призводити до змін вмісту актину [Afadlal S., Labetoulle R.,]. Оскільки нашим цільовим інтересом були нейроспецифічні протеїни цитоскелету, то для визначення наявності змін у вмісті актину ми обрали умови Av-T та найбільш чутливу до цих умов ділянку головного мозку – мозочок. Результати наведено на рис. 3.27

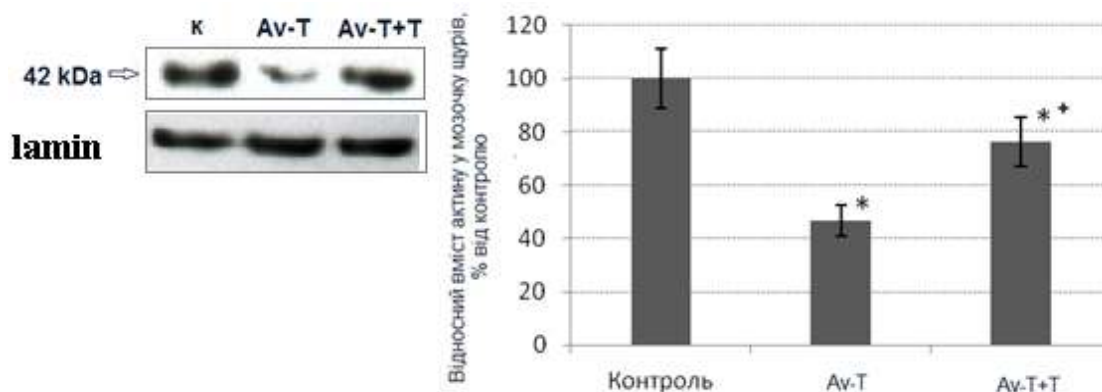


Рис. 3.27. Відносний вміст актину у мозочку тварин контролю, з аліментарним авітамінозом (Av-T), та щурів з корекцією тіаміном (Av-T+T). Дані представлено як $M \pm m$ ($n=6-7$). * $P < 0.05$ у порівнянні з контролем, + $P < 0.05$ у порівнянні з Av-T.

Результати на рис. 27 демонструють зниження вмісту актину до 50% від контрольного значення в умовах аліментарного авітамінозу, тоді як введення високої дози тіаміну підвищує цей показник до 78%. Цей результат підтверджує припущення щодо включення протеїнів цитоскелету у метаболізм лабільного пулу тіаміну.

3.4.2 Вміст GFAP у відділах головного мозку щурів за умов Av-T, Hv-T та їх корекції

Хоча останнім часом тваринні моделі ТД широко використовуються для вивчення нейродегенеративних станів, дані літератури, що описують ступінь пошкодження астроцитів у різних ділянках мозку при ТД-асоційованих станах дуже обмежені. Як відомо, астроцити є важливим типом клітин, необхідним для підтримки цілісності нейронів у мозку. Сучасні джерела літератури вказують на те, що в умовах ТД в цих гліальних клітинах відбуваються значні зміни – від компенсаторного розростання на початкових стадіях до пригнічення у випадках глибокого ТД. Через порушення обміну речовин, що виникають внаслідок ТД, експресія ключових протеїнів, що характеризують функцію астроцитів, різко змінюється, разом з важливими змінами в функції цих клітин, які в кінцевому рахунку може призвести до занепаду нейронів. Ми дослідили та порівняли зміни

у рівні GFAP (функціонального маркера астроцитів) за умов Ав-Т та Нв-Т у різних відділах головного мозку: корі великих півкуль, мозочку та гіпокампі та перевірили, чи можливо нівелювати виявлені зміни введенням високої дози тіаміну (200 мкг/100 г ваги) за добу до термінації експерименту. Результати наведено на рис. 3.28 та 3.29.

Дані імуноблоттинга демонструють, що розвиток Ав-Т призводить до зниження рівня GFAP у всіх досліджуваних відділах мозку, в середньому, до 60% від контрольного значення. При одноразовому введенні тіаміну спостерігається часткове відновлення вмісту астроцитарного маркера, який у різних відділах мозку збільшується до 80% від контрольного значення.

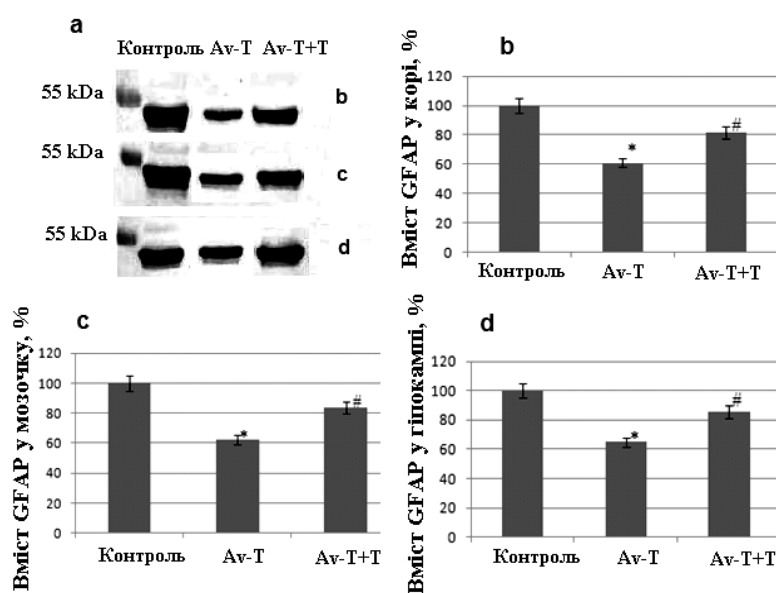


Рис. 3.28 Відносний вміст гліального фібрилярного кислого протеїну у відділах головного мозку тварин контролю, групи з аліментарним авітамінозом (Av-T), та групі з коригуванням тіаміном (Av-T+T). Блотограма—(a), вміст GFAP у корі великих півкуль (b), мозочку (c) та гіпокампі (d) Дані наведено у відсотках від контролю. Дані представлено як $M \pm m$. ($n=6-7$) *- $P < 0,05$ по відношенню до

контрольного значення, #- $P < 0,05$ по відношенню до групи d.

У випадку Нв-Т відбувалося менш значне зменшення вмісту GFAP в різних відділах головного мозку щурів. Однак в умовах недостатнього надходження тіаміну також спостерігався розвиток астрогліальної дисфункції, викликаной ТД. Найбільш чутливою структурою до Нв-Т виявився мозочок (рис. 3.22 В), однак саме в ньому коригування одноразовим введенням тіаміну мало найбільший ефект – рівень GFAP нормалізувався до контрольного значення

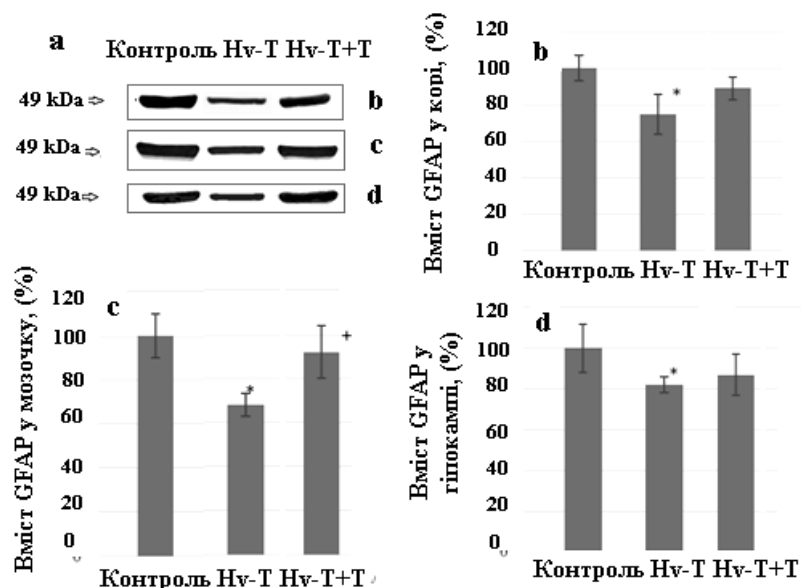


Рис. 3.29 Відносний вміст гліального фібрилярного кислого протеїну. Блотограма усіх відділів (a) та вміст GFAP у корі великих півкуль (b), мозочку (c) та гіпокампі (d) тварин контролю, з аліментарним гіповітамінозом (Hv-T), та з коригуванням тіаміном (Hv-T+T). Дані наведено у відсотках від контролю. Дані представлено як $M \pm m$. (n=6-7) *-

$P < 0,05$ по відношенню до контрольного значення, +- $P < 0,05$ по відношенню до групи Hv-T.

Отримані нами дані узгоджуються з попередніми, щодо чутливості астроцитів до ТД різного ступеня – навіть за умов обмеженого надходження тіаміну спостерігається зниження вмісту GFAP. Однак ці зміни зворотні, про що свідчить підвищення вмісту протеїну при одноразовому введенні вітаміну. Можна зробити висновок, що нормалізація тіамінзалежних процесів при введенні тіаміну тваринам з ТД сприяє, що має важливе значення для реалізації її нейропротекторної функції.

3.4.3 Вміст GFAP у відділах головного мозку щурів за умов хронічного алкоголізму та його корекції

Вважається, що етиловий спирт є найбільш споживаним нейротоксином по всьому світу, тоді як хронічна алкогольна інтоксикація або надмірне вживання алкоголю змінюють структуру та функції мозку через сприяння запальним процесам, підвищують пошкодження ДНК та індукують окислювальний стрес (Mehta, 2016). Астроцити є основною мішенню етанолу в людському мозку (R F Butterworth, 1995; de la Monte & Kril, 2014). Адаптацію астроцитів зазвичай вимірюють за допомогою імунореактивності GFAP (Sofroniew & Vinters, 2010).

Наприклад, показано, що щільність (клітини на об'єм області) астроцитів, що експресують GFAP (GFAP +), є нижчою у префронтальній корі щурів, які надавали перевагу етанолу над водою (Jose Javier Miguel-Hidalgo, 2005). Більше того, зменшення кількості клітин повідомлялося для декількох типів гліальних клітин у моделях тварин фетального алкогольного синдрому (FAS) (Wilhelm & Guizzetti, 2015). Навпаки, збільшення кількості GFAP + астроцитів спостерігається у корі головного мозку щура після багаторазового введення високої дози етанолу (Dalçik et al., 2009; Udomuksorn, Mukem, Kumarnsit, Vongvatcharanon, & Vongvatcharanon, 2011). Щільність астроцитів також збільшується у корі щурів під час етанолової абстиненції (Jose J Miguel-Hidalgo, Overholser, Meltzer, Stockmeier, & Rajkowska, 2006). Важливим є те, що у щурів зміни щільності GFAP+ астроцитів залежать від часу, відділу та способу введення етанолу (Bull, Syed, Minter, & Bowers, 2015). Незважаючи на загальновизнаний факт, що є регіональні відмінності у вразливості до нейротоксичних ефектів хронічного прийому етанолу, наші дані свідчать про те, що тривале споживання етанолу в досліджуваному режимі може викликати глибокі подібні зміни в більшості структур мозку. Ми вважаємо, що детальні дослідження стану астроглії за умов алкогольної інтоксикації необхідні, щоб забезпечити більш повне уявлення про пошкодження мозку, пов'язані з алкоголем, та можливі шляхи його терапевтичного лікування.

Дослідження рівня GFAP у випадку гострої алкогольної інтоксикації (чотири тижні вживання 15% розчину алкоголю) продемонструвало часткове пригнічення астроцитарного маркера у всіх досліджуваних відділах, (рис. 3.30. та табл 3.1) найбільш виразно – у мозочку у 2 рази по відношенню до значення контрольної групи, а найбільш стійкою структурою до алкогольного ураження виявилася кора великих півкуль, в котрій зниження вмісту GFAP становило 30%. Введення тіаміну майже повністю відновлювало рівень протеїну до контрольного значення у мозочку, що підтверджує дані про його найбільшу динамічність серед структур головного мозку, тоді як у корі відновлення відбувалось до 80% від

контрольного значення, а у гіпокампі показник у групі з коригуванням не мав вірогідної відмінності від групи, що не мала корекції.

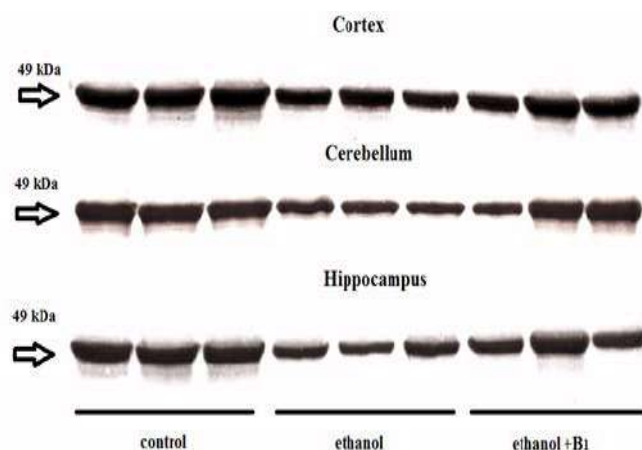


Рис. 3.30 Блотограма вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну за умов норми (control) гострого алкоголізму (ethanol) та введення тіаміну (ethanol+B₁) у корі, мозочку та гіпокампі. (n=6-7)

Табл. 3.1 Відносний вміст GFAP у відділах головного мозку щурів за умов гострого алкоголізму

В ідділ	Контроль	Етанол	етанол+B ₁
Кора великих півкуль	1,00±0,10	0,69±0,04*	0,83±0,04* ⁺
Мозочок	1,00±0,07	0,53±0,11*	0,93±0,11* ⁺
Гіпокамп	1,00±0,02	0,54±0,16*	0,73±0,23*

*- P<0,05 по відношенню до контрольного значення, +- P<0,05 по відношенню до групи ethanol.

За умов хронічного алкоголізму (дев'ять місяців вживання 15% розчину етанолу) зміни рівню GFAP були більш драматичними: на імуногістограмі тканин мозочку та кори (рис 3.31 (2) та 3.32 (2)) тварин з алкогольної групи сигнал GFAP⁺ клітин був майже відсутній, та введення самого лише тіаміну не призводило до суттєвого покращення, особливо у мозочку (рис 3.31(3) та 3.32(3)). Однак комбінація тіаміну з Метовітаном мала виразну нормалізуючу дію як у мозочку, так и у корі великих півкуль (рис 3.31 (5) та 3.32 (5)), що може пояснюватись потужною антиоксидантною дією препарату.

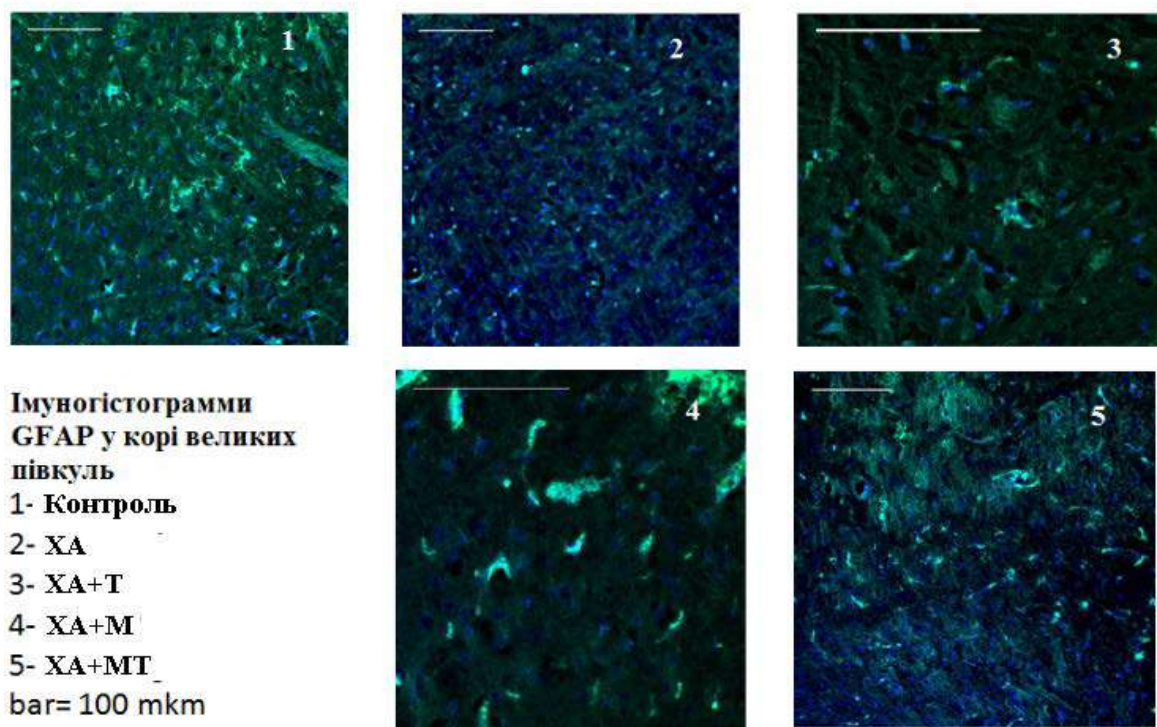


Рис. 3.31 Імуногістограми мозочку контрольних тварин (1), тварин що хронічно споживали розчин етанолу (2) та після цього отримали одноразово за добу до декапітації 200 мкг/кг тіаміну (3), 200 мкг/кг Метовітану (4) або комбінацію препаратів (5). Зелене забарвлення – GFAP. Bar= 100 мкм.

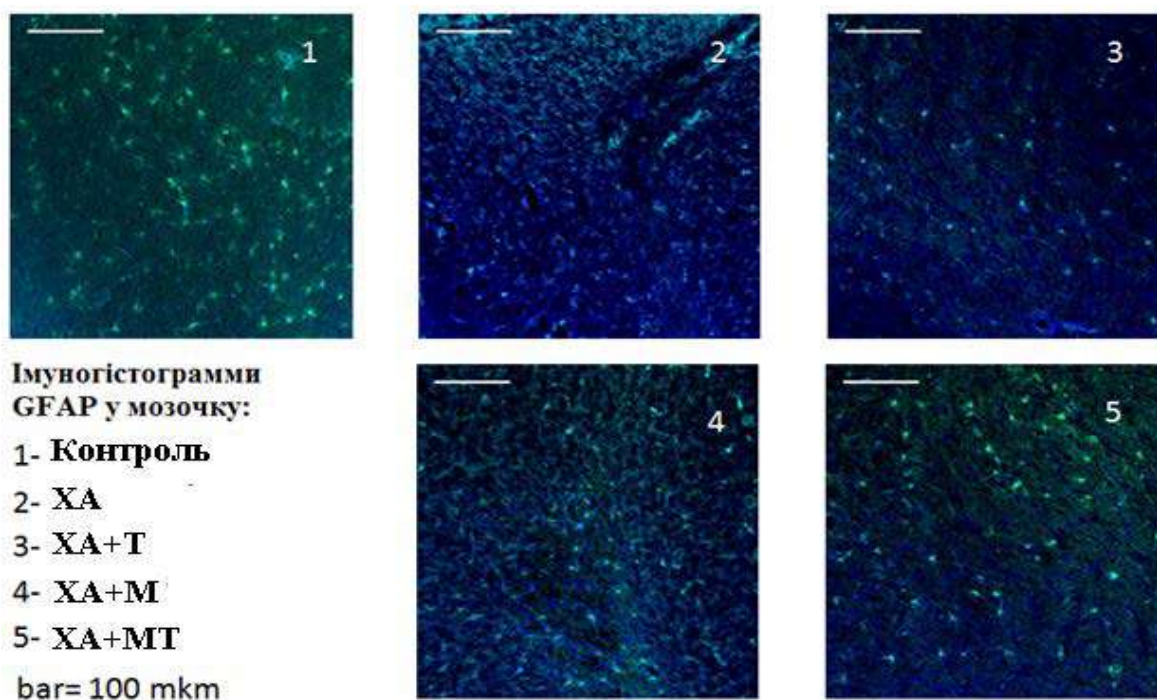


Рис. 3.32 Імуногістограми кори великих півкуль контрольних тварин (1), тварин що хронічно споживали розчин етанолу (2) та після цього отримали одноразово за добу до декапітації 200 мкг/кг тіаміну (3), 200 мкг/кг Метовітану (4) або комбінацію препаратів (5). Зелене забарвлення – GFAP. Bar= 100 мкм.

Узагальнюючи вищенаведене, можна зробити висновок, що за умов гострої інтоксикації етанолом можливе відновлення гліальних клітин введенням високої дози тіаміну, тоді як при хронічному алкоголізмі коригуюча дія вітаміну можлива лише за умов сумісного введення його з препаратом Метовітан, який сприяє активації системи антиоксидантного захисту клітини. Також результати продемонстрували, що найбільш швидко відновлювальним відділом головного мозку (за рівнем GFAP) виявився мозочок, тоді як гіпокамп продемонстрував найменшу реактивність.

3.4.4 Вміст триплету нейрофіламентів (NF) за умов ТД та його корекції.

У цілому відомо, що зниження вмісту ТДФ у нервовій тканині призводить до зниження щільності дендритових хребтів *in vitro* та *in vivo*, зниження збудливої нейротрансмісії та порушення тривалого потенціювання гіпокампа (Yu et al., 2018). ТД також індукує регіонально-селективну нейродегенерацію в мозку ссавців, зокрема в специфічних ядрах таламуса (субмедіальні ядра таламуса і вентральних бічних ядрах) і мозочоку (Mouton-Liger et al., 2015). Також відомо, що введення тіаміну та бенфотіаміну запобігає пригніченню гіпокампального нейрогенезісу індукованого стресом (Vignisse et al., 2017).

Дані щодо змін в стані нейрофіламентних протеїнів дуже обмежені. Аналіз нейрофіламентного протеїну α -інтернексину шляхом імуноблотінгу (Alan S Hazell & Wang, 2011) показав, що у щурів з піритіамін-індукованим ТД (ПТД) на симптоматичній стадії рівень цього протеїну в медіальному таламусі знижувався на 26% порівняно з контрольною групою. У медіальному таламусі досимптоматичної групи не було виявлено ніяких змін у рівні протеїну. Аналогічним чином вміст α -інтернексину не змінювався в лобовій тім'яній корі обох груп тварин ПТД (Alan S Hazell & Wang, 2011).

Ми дослідили зміни вмісту триплету нейрофіламентів (NF). Це є компонент проміжних філаментів нейронів, маркер функціонального стану нейронів. За умов Нv-Т жодних змін у рівні NF не відбувалося (дані не показано), хоча клітини глії вже зазнавали негативних змін (рис. 3.29). Це свідчить про те, що

навіть за умов часткового пригнічення астроцити здатні виконувати нейропротекторну функцію.



Рис. 3.33 Відносний вміст протеїнів триплету нейрофіламентів у корі великих півкуль, мозочку та гіпокампі тварин трьох експериментальних груп: контролю, аліментарного авітамінозу (Av-T) та групи з корекцією (Av-T+T). (n=6-7)

Зміни в рівні NF спостерігаються тільки за умов глибокого дефіциту тіаміну (рис. 3.33) – аліментарного авітамінозу, причому зниження вмісту протеїнів відбувається тільки в одному з трьох досліджуваних відділів - у мозочку, що підтверджує попередні повідомлення (Patrick J Mulholland, 2006; Nauti et al., 1997) про підвищену чутливість цієї структури до ТД. Показник у групі Av-T знижується до 65% відносно контрольного значення, однак введення тіаміну нівелює ці зміни та навіть стимулює підвищення вмісту NF – значення у групі Av-T+T на 20% перевищує рівень контролю. В корі великих півкуль та гіпокампі змін ані за умов патологічного стану, ані за корекції не спостерігається.

Результати, наведені у цьому розділі демонструють, що серед клітин нервової тканини найбільшу чутливість до ТД проявляють астроцити, що цілком узгоджується з попередніми повідомленнями (Afadlal et al., 2014; Alan S Hazell, n.d.). Навіть у випадку Hv-T рівень GFAP знижується (3.29), тоді як рівень NF залишається без змін. За умов Av-T при введенні тіаміну у першу чергу відновлюється рівень NF, тоді як вміст астроцитарного маркера підвищується

лише частково, що свідчить про пріоритетність нейронів при розподілі тіаміну у головному мозку. Хронічна алкоголізація призводить до суттєвого зниження GFAP і відновити його рівень введенням високої дози тіаміну не є можливим, однак сумісне введення з препаратом Метовітан підвищує вміст GFAP+ клітин до контрольного рівня. Це пояснюється потужними антиоксидантними властивостями препарату, що нівелюють оксидний стрес який розвивається за цих патологічних умов.

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Згідно даних ВООЗ кількість захворювань, що призводять до патологічних нейродегенеративних змін зростає. Останні дані з поширеності цих патологій у світі демонструють, що нейродегенеративні захворювання входять до п'ятірки найпоширеніших, поступаючи тільки серцево-судинним, онкологічним та інфекційним захворюванням (Feigin et al., 2017). Як вже згадувалось у роботі, більшість нейродегенеративних захворювань супроводжуються в той чи іншій мірі вираженим дефіцитом тіаміну (Haas, 1988; Mouton-Liger et al., 2015). Однак молекулярні механізми розвитку цих станів залишаються не з'ясованими, як і питання щодо першопричини та ініціюючого фактору залишається відкритим. В цьому розділі ми спробуємо узагальнити отримані результати, пояснити їх з точки зору системної біології та оцінити їх внесок у фундаментальну та прикладну вітамінологію.

Оскільки не можна виключити того, що для розвитку згаданих патологій ТД та/ або порушення обміну тіаміну можуть виявитися ініціюючим фактором, та враховуючи те, що дослідники все частіше використовують експериментальні моделі ТД для вивчення механізмів розвитку нейродегенеративних процесів (Reed, 1981), ми, у першу чергу, охарактеризували обрані нами моделі ТД (аліментарний а- та гіповітамінози та хронічний алкоголізм) за показниками вмісту тіаміну та його коензимної форми та за загальними показниками окисно-відновного стану організму у запропонованих умовах. Згідно з експериментальними даними, отриманими раніше (Tumanov & Trebukhina, n.d.) , при обмеженому надходженні тіаміну в організм найостанніший орган, в якому починає знижуватися рівень тіаміну і його біологічно активної форми - це мозок. До останньої можливості організм підтримує метаболізм в нервових клітинах за рахунок «перекачування» вітаміну з інших органів. Результати, отримані на досліджених нами моделях демонструють, що це є справедливим у випадку гіповітамінозу та хронічного алкоголізму. Той факт, що на моделі авітамінозу спостерігається істотне зниження рівня ТДФ в тканини мозку, говорить про

гострий глибокий дефіцит вітаміну в організмі. Оскільки ми використовували хронічний варіант споживання алкоголю щурами (дев'ять місяців вживання 15% розчину етанолу) можливо, що організм пристосовується до патологічних умов і тоді реалізує компенсаторну перекачку тіаміну у мозок.

Оскільки в літературі досить широко обговорюється питання, яку роль оксидативний стрес (ОС) відіграє у розвитку нейродегенеративних змін при різних патологіях, узагальнення існуючих даних дозволяє зробити кілька висновків, які знаходять підтвердження і в публікаціях Гібсона і співавторів (Gibson & Zhang, 2002) : 1) ТД підсилює оксидативний стрес (ОС); 2) тіамінзалежні ензими і процеси чутливі до розвитку ОС; 3) введення тіаміну за певних умов запобігає розвитку ОС; 4) інші антиоксиданти можуть частково усувати зміни, індуковані ТД. На підставі подібних тверджень можна було б припустити, що ОС, який супроводжує ТД, може являти собою основну причину розвитку нейродегенеративних змін. Однак досі залишається нез'ясованим питання щодо ініціюючого фактору у зв'язку між ОС та ТД при розвитку цих змін. І якщо превентивний характер тіаміну при розвитку ОС є встановленим фактом (Kartal & Palabiyik, 2019), то можливість нівелювання наслідків дії ОС на організм введенням високих доз тіаміну ще не вивчалася. Для того, щоб детальніше дослідити ці питання ми визначали загальні параметри окисно-відновного стану нервової тканини, такі як відносний рівень АФК і рівень SH-груп у мозку щурів наприкінці розвитку моделей. Результати продемонстрували, що рівень АФК зменшується в мозку щурів з гіповітамінозом (Hv-T) після трьох тижнів дієти і продовжує поступово зменшуватися до кінця експерименту. Слід зазначити, що за умов Hv-T невелика кількість тіаміну постійно надходить до організму з дієтою, що ймовірно є причиною запобігання надмірного утворення вільних радикалів. В той же час через три тижні у групі аліментарного авітамінозу (Av-T), коли організм зовсім не отримує тіамін з їжі, рівень АФК значно перевищує таку ж величину в контролі. Зменшення рівня АФК протягом експерименту у групі Hv-T пояснюється уповільненням окислювально-відновних реакцій у клітинах їх

мозку. Крім того, може бути, що кількість тіаміну, яка надходить в мозок за цих умов, достатня для нейтралізації надлишкового вмісту вільних кисневих радикалів. Це цілком можливо, оскільки похідні тіаміну здатні взаємодіяти з такими структурами (І. М. Parkhomenko, Stepuro, et al., n.d.). Дослідження вищезначених показників продемонстрували зниження вмісту сульфгідрильних груп у тварин з обох моделей ТД, але у випадку Нv-Т жодним чином не відбилися на рівні АФК. За умов хронічного алкоголізму порушується Red-Ox баланс та спостерігається зсув рівноваги у бік розвитку окисного стресу, що відбивається на підвищенні вмісту АФК та зниженні рівня сульфгідрильних груп. Скорегувати патологічний стан введенням тіаміну виявилось можливим лише за сумісного введенні його з препаратом Метовітан. Цей препарат, активуючи процеси трансметилування та маючи у своєму складі токоферол, підсилює функціонування клітинної системи антиоксидантного захисту (Anisimova et al., n.d.). Вочевидь у нашому випадку дія препарату направлена на нормалізацію редокс-стану нервової тканини, без якої сам тіамін не здатен відновити досліджувані параметри до контрольного рівню.

Відомо, що транспортувати до клітини катіон тіаміну, або його електронейтральну форму ТМФ, здатні кілька сімейств транспортерів (Manzetti et al., 2014). Однак високоафінним до тіаміну протеїном-переносником, що експресується саме у нервових клітинах є THTR-1 (Dutta et al., 1999). Тому, у першому приближенні, за вмістом та рівнем експресії цього протеїну можна оцінювати стан транспортної системи тіаміну у нервових клітинах за умов норми та патології. Результати продемонстрували підвищення вмісту THTR-1, що відбувається вже на рівні експресії гену *slc19A2*, у всіх досліджуваних відділах у відповідь на аліментарний авітаміноз. Також стало відомо, що ці зміни (тобто фактично біосинтез транспортеру) безпосередньо не залежать від надходження тіаміну, оскільки реакція з боку транспортеру на введення високої дози тіаміну відсутня. Оскільки введення тіаміну також не відновлює рівень ТДФ у випадку

Av-T, є підстави припустити, що саме рівень ТДФ в клітинах може бути фактором, регулюючим експресію транспортера THTR-1.

Оцінюючи стан протеїнів(за рівнем, експресією та активністю), задіяного в захваті тіаміну в нервові клітини THTR-1 - (Рис.3.14) і виконуючого перетворення його на ТДФ - ТПК (Рис. 3.25) в трьох досліджуваних розділах мозку можна бачити, що їх вміст і, ймовірно, експресія достовірно знижується за умов хронічного споживання щурами алкоголю. За цих умов знижується також активність ТПК в мозку (Рис.3.24), проте, вміст ТДФ в цільному мозку залишається на рівні контролю (Рис. 3.9). Слід зазначити, що зниження активності ТПК при хронічній дії алкоголю спостерігали і інші автори (Rindi, 1989), тобто це є факт добре встановлений. За цих умов підтримання концентрації продукту реакції (ТДФ) на рівні контролю можливо за рахунок утворення окисненої форми ТДФ, яка здатна блокувати активність ензиму. Оскільки наші результати продемонстрували зниження вмісту транспортеру за умов хронічного алкоголізму, можна припустити що надходження тіаміну відбувається за рахунок інших транспортних систем що здатні до переносу тіаміну, або за рахунок пасивної дифузії. Також не можна виключити варіант, що у випадку зниження вмісту транспортеру цей протеїн не тільки втрачає можливість переносити тіамін до клітини, але й транспортувати його з клітини до позаклітинного матріксу, що призводить до накопичення тіаміну у мембранах клітин .

Неоднорідні зміни рівня імунореактивності THTR-1 в досліджених відділах мозку за умов гіповітамінозу вимагає подальшого з'ясування, але ці дані вже свідчать про неоднакову швидкість обміну в різних ділянках мозку, що підтверджується і дослідженнями Rindy et al. Однак на підставі отриманих даних можна припустити, що цей показник не залежить безпосередньо від рівня надходження тіаміну, а, швидше за все, зміни в рівні та експресії транспортера тіаміну корелюють зі змінами в протеїнах цитоскелету, що залежать від стану метаболічних процесів.

Існує кілька факторів, з котрими пов'язують підвищену чутливість нервової тканини до нестачі тіаміну (Bettendorff et al., 1996; Gibson et al., 2016; Ke et al., 2003). Одним з таких факторів є надважливе значення нормального функціонування вуглеводного обміну для головного мозку (Bâ, 2008). Оскільки це нормальне функціонування неможливе без активної форми тіаміну – ТДФ, то наступним нашим завданням було дослідити рівень, експресію та активність ензиму, відповідального за його синтез, тіамініпрофосфокінази (ТПК), в умовах різної забезпеченості організму вітаміном. Ми встановили, що за умов Ав-Т відбувається суттєве пригнічення функціональності ТПК: знижується як активність ензиму у загальному гомогенаті мозку так і вміст у різних його відділах. Ймовірно, що первинною причиною такої відповіді є однонаправлені зміни в експресії гену ТПК і рівень тіаміну або ТДФ у клітинах впливає на цей процес. Більш виражене зниження за умов Ав-Т рівня протеїну ТПК порівняно із зниженням рівня мРНК ТПК можна пояснити різними причинами, наприклад, активацією протеоліза апоензиму ТПК при відсутності коензиму, або певними посттрансляційними модифікаціями цього протеїну за умов Ав-Т, що знижують його активність і імунореактивність. В той же час дані демонструють, що ці зміни є зворотними - введення тіаміну підвищує активність ензиму, хоча й не відновлює її до рівня контролю та призводить до активації експресії гену *tpk-1* у всіх досліджуваних відділах що відбивається на підвищенні вмісту протеїну. За аліментарного гіповітамінозу спостерігається підвищення синтезу цього протеїну та активності ензиму, що відбувається на фоні зниження вмісту ТДФ. Аналізуючи ці дані, можна прийти до висновку щодо наявності зворотної кореляції у стані ензиму та вмісті коензимної форми тіаміну.

Довгий час питання щодо спряження двох послідовних процесів: надходження тіаміну до клітини та перетворення його на коензимну форму – ТДФ залишалося предметом дискусій. Ці процеси відбувалися майже одночасно, що давало підстави припускати локалізацію ензиму, відповідального за синтез ТДФ – ТПК, у плазматичній мембрані (Воскобоев, 1987). Пізніше було доведено

цитозольну локалізацію цього ензиму (Brown, 2014; J.-Y. Liu, Timm, & Hurley, 2006b). Але питання щодо розташування його у клітині та можливу ступінь асоціації протеїну з плазматичною мембраною все ще залишалось дискусійним. Припущення щодо зміни асоціації ТПК з плазматичною мембраною в залежності від забезпеченості клітини тіаміном виникло на підставі результатів аналізу активності ТПК в тканині мозку за умов хронічного алкоголізму (Yulia M Parkhomenko et al., 2011). Виявилось, що оцінка зміни активності ТПК в тканині мозку щурів за умов хронічного алкоголізму відповідно контролю залежала від того, визначалась активність в цільному гомогенаті мозку чи в цитозольній фракції гомогенату, відокремленої від мембран. У першому випадку зміни в активності ТПК майже не спостерігались, а при визначенні активності в цитозолі відмічалось достовірне її зниження у порівнянні з контролем. Такий результат свідчив про видалення разом з мембранами значної долі ТПК із цитозолу щурів з алкоголізмом, що могло бути наслідком підвищення асоціації ензиму з мембранами за цих умов. Оскільки алкоголізм супроводжується дефіцитом тіаміну в організмі, ми припустили, що саме зниження забезпечення клітин тіаміном може бути причиною вищезазначених змін. В даній роботі це припущення перевірялось в дослідях на клітинах мишачої культури нейробластоми, які культивувались на тіамін дефіцитному (ТД) середовищі. Порівняння результатів імуноцитохімії ТПК для клітин що росли на ТД середовищі з результатами клітин, що культивувались на повноцінному середовищі, продемонструвало, що у першому випадку забарвлення є більш ущільненим біля клітинної мембрани. Введення високої дози тіаміну до ТД клітин призводило до рівномірного перерозподілу забарвлення у клітині. На нашу думку, асоціація ТПК з плазматичною мембраною за умов уповільнення надходження тіаміну у клітину може бути одним із факторів, що протидіє зниженню синтезу ТДФ і сприяє підтриманню більш-менш постійного його рівня в клітинах мозку за умов дефіциту тіаміну.

Чисельні експериментальні спостереження свідчать, що хронічне вживання алкоголю незмінно супроводжується дефіцитом тіаміну (Bâ, 2011; R F Butterworth et al., 1991; Polegato et al., 2019) і наслідком цього досить часто є розвиток синдрому Верніке-Корсакова. Зважаючи на цю інформацію, ми ретельно досліджували як наявність змін у вмісті протеїну та активності ТПК так і оцінювали їх зворотність за відповіддю на введення високої дози тіаміну, Метовітану та їх комбінації. Ми спостерігали, що хронічне споживання алкоголю призводить до пригнічення біосинтезу ТПК та зниження активності ензиму. Ймовірно, що це пригнічення є результатом синергічної негативної дії ТД та порушення Red-Ox балансу, що супроводжує патологічний стан. Це підтверджується відповіддю організму на різні варіанти корекції: найбільш виразну нормалізуючу дію мала комбінація препаратів, тоді як введення лише одного тіаміну не мало ефекту у всіх досліджуваних відділах. В цілому результати роботи вказують на можливість тіамін-залежної регуляції синтезу і функціонального стану ТПК в клітинах нервової тканини, оскільки, на відміну від транспортеру, у випадку з авітамінозом всі досліджувані відділи відповідали підвищенням експресії гену *tpk-1* у відповідь на одноразове введення високої дози тіаміну

Чисельні експериментальні спостереження щодо некоензимних механізмів дії вітаміну B₁, накопичені на цей час, дають підстави заключити, що некоензимні ефекти вітаміну B₁, які в значній ступені обумовлюють його нейротропність, ґрунтуються в основному на взаємодіях тіаміну і його похідних зі структурами біологічних мембран (Bâ, 2008; Yu. M. Parkhomenko et al., 2016). Маючи на увазі ці уявлення, ми вважаємо, що одним із перспективних шляхів з'ясування механізмів нейротропності тіаміну є спостереження змін у протеїнах динамічних структур нервової тканини за умов ТД, насамперед – протеїнах цитоскелету. Зважаючи на тканинну специфічність деяких протеїнів, ми досліджували зміни у стані гліального фібрилярного кислого протеїну (маркеру астроглії) та триплету нейрофіламентів (маркеру нейрональних клітин) у запропонованих нами умовах.

Наші результати підтверджують вже відому підвищену чутливість астроцитів до ТД різного ступеня (Afadlal et al., 2014). Ми спостерігали, що навіть за умов обмеженого надходження тіаміну, тобто за розвитку гіповітамінозу, спостерігається зниження вмісту GFAP. Однак ми вперше продемонстрували, що зміни зворотні, та рівень GFAP напряму залежить від надходження тіаміну в організм, про що свідчить підвищення вмісту протеїну при одноразовому введенні вітаміну. Можна зробити висновок, що нормалізація тіамінзалежних процесів при введенні тіаміну тваринам з ТД сприяє відновленню метаболічної активності клітин астроглії, що має важливе значення для реалізації її нейропротекторної функції. Відомо, що астроцити відіграють важливу роль у процесах детоксикації як етанолу, так і продуктів його метаболізму в мозку. Детально досліджено вплив етанолу на стан астроцитів; отримані дані, однак, досить суперечливі (Guerri & Renau-Piqueras, 1997; Udomuksorn et al., 2011). Це пов'язано, в першу чергу, з тим, що картина і напрямок зміни кількості GFAP залежить від дози та тривалості цього споживання токсиканта. Наші результати демонструють, що за умов гострої інтоксикації етанолом відбувається пригнічення клітин астроглії, що відбивається на зниженні вмісту GFAP. Однак ці зміни зворотні, та напряму залежать від надходження тіаміну, оскільки результати імуноблотінгу демонструють, що відновлення гліальних клітин введенням високої дози тіаміну є можливим. При хронічному алкоголізмі відновити пригнічення астроцитів можливо лише за умов сумісного введення високої дози тіаміну з препаратом Метовітан. Дослідження вмісту астроцитарного маркеру у кількох відділах головного мозку показало, що найбільш швидко відновлювальним відділом головного мозку (за рівнем GFAP) виявився мозочок, тоді як гіпокамп продемонстрував найменшу реактивність.

Дані літератури щодо змін вмісту нейрофіламентів в умовах ТД наразі відсутні. Тому наші результати, що демонструють стійкість нейронів до нестачі тіаміну у порівнянні з клітинами глії – фактично перше повідомлення у цьому питанні. Ми встановили, що незважаючи на суттєве пригнічення GFAP вже під

час гіповітамінозного стану, рівень нейрофіламентів залишається на рівні контролю, і тільки під час глибокого авітамінозу можна спостерігати часткове зниження вмісту NF у мозочку, що також підтверджує інформацію щодо підвищеної чутливості саме цієї структури головного мозку до ТД. Варто підкреслити, що при введенні тіаміну у першу чергу відновлюється рівень NF, тоді як вміст астроцитарного маркера підвищується лише частково, що свідчить про пріоритетність нейронів при розподілі тіаміну у головному мозку.

Узагальнюючи вищенаведене обговорення результатів можна заключити що отримані у дисертаційній роботі експериментальні результати поглиблюють та розширюють сучасні уявлення про клітинно-молекулярні особливості розвитку тіамін-дефіцитних станів, некоензимні функції тіаміну та підвищену чутливості до ТД нервової системи.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вперше проведено комплексне дослідження стану протеїнів, від яких залежить швидкість синтезу ТДФ у нервових клітинах, а саме, транспортера тіаміну (THTR-1) і тіамінпірофосфокінази (ТПК) та маркерних протеїнів цитоскелету нервових клітин, за умов дефіциту тіаміну (ТД) різної етіології. Отримані результати дозволяють зробити наступні висновки:

1. Усі досліджувані тіамін-дефіцитні стани характеризуються зниженням вмісту тіаміну у печінці та підтриманням максимально можливого рівня ТДФ у головному мозку, що свідчить про пріоритетність нервової тканини у розподілі тіаміну в організмі
2. Порівняльне дослідження Red-Ox балансу в тканині мозку при В₁-авітамінозі і В₁-гіповітамінозі свідчить, що режим надходження тіаміну до клітин мозку є важливим для їх функціонування: обмежене але постійне надходження тіаміну попереджає розвиток ознак оксидативного стресу, що підтверджує можливість взаємодії молекули тіаміну із вільними радикалами

за фізіологічних умов. Одноразове введення високої дози тіаміну щурам з аліментарним авітамінозом призводить до нормалізації загальних показників Red-Ox балансу в мозку

3. Виявлено протилежно спрямовані зміни в стані транспортера тіаміну (THTR-1) і тіамінпірофосфокінази (ТПК) за умов B_1 гіпо- та авітамінозу, що свідчить про спряженість їх функціонування у клітинах.
4. За умов хронічного споживання алкоголю у відділах мозку щурів спостерігається пригнічення активності і вмісту як THTR-1 так і ТПК, що свідчить про відмінність цієї моделі ТД від моделей аліментарного походження за етіологією.
5. Виявлено, що підвищення вмісту THTR-1, яке відбувається на рівні експресії гену *slc19A2* у всіх досліджуваних відділах мозку за умов аліментарного авітамінозу, неможливо нівелювати введенням високої дози тіаміну.
6. Порушення Red-Ox балансу у бік розвитку окиснювального стресу за авітамінозу може спричиняти гальмування біосинтезу ТПК на етапі трансляції цього протеїну. Вміст та активність ТПК частково відновлюється одноразовим введенням високої дози тіаміну.
7. Встановлено, що за умов ТД відбувається збільшення асоціації ТПК з плазматичною мембраною що може бути наслідком змін в клітинних структурах. Введення високої дози тіаміну до ТД клітин призводить до рівномірного перерозподілу забарвлення у клітині. Зокрема, ці зміни в локалізації ТПК можуть сприяти підтриманню більш-менш постійного рівня ТДФ в клітинах мозку за умов дефіциту тіаміну.
8. Підтверджено підвищену чутливість астроцитів до ТД різного ступеня – навіть за умов обмеженого надходження тіаміну спостерігається зниження рівня GFAP. Ці зміни зворотні, та напряду залежать від надходження тіаміну, про що свідчить підвищення вмісту протеїну при одноразовому

введенні вітаміну. При хронічному алкоголізмі коригуюча дія вітаміну можлива лише за умов сумісного введення з антиоксидантним препаратом.

9. Зміни в рівні триплета нейрофіламентів (NF) спостерігаються тільки за умов глибокого аліментарного авітамінозу, причому зниження вмісту протеїнів відбувається тільки у мозочку, що свідчить про підвищену чутливість цієї структури до ТД. При одноразовому введенні тіаміну, у першу чергу, відновлюється рівень триплету, тоді як вміст астроцитарного маркеру- GFAP- підвищується лише частково, не досягаючи рівня контролю, що свідчить про пріоритетність нейронів при розподілі тіаміну у головному мозку.

Список використаних джерел

- Abdelhameed, A. S., Nusrat, S., Paliwal, S., Zaman, M., Zaidi, N., & Khan, R. H. (2017). A multitechnique approach to probe the interaction of a therapeutic tyrosine kinase inhibitor nintedanib and bovine serum albumin. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 47(7), 655–663.
<https://doi.org/10.1080/10826068.2016.1275014>
- Abdul-Muneer, P. M., Alikunju, S., Schuetz, H., Szlachetka, A. M., Ma, X., & Haorah, J. (2018). Impairment of Thiamine Transport at the GUT-BBB-AXIS Contributes to Wernicke's Encephalopathy. *Molecular Neurobiology*, 55(7), 5937–5950. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0811-0>
- Abe, T., & Itokawa, Y. (1977). Effect of ethanol administration on thiamine metabolism and transketolase activity in rats. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Fur Vitamin- Und Ernährungsforschung. Journal International de Vitaminologie et de Nutrition*, 47(4), 307–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/591201>
- Afadlal, S., Labetoulle, R., & Hazell, A. S. (2014). Role of astrocytes in thiamine deficiency. *Metabolic Brain Disease*, 29(4), 1061–8. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9571-y>
- Agyei-Owusu, K., & Leeper, F. J. (2009). Thiamin diphosphate in biological chemistry: analogues of thiamin diphosphate in studies of enzymes and riboswitches. *The FEBS Journal*, 276(11), 2905–16.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07018.x>
- Ali, B. H. (1985). Effect of some monoamine oxidase inhibitors on the thiamin status of rabbits. *British Journal of Pharmacology*, 86(4), 869–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4075020>

- Alzheimer's Association. (2013). 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 9(2), 208–45. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.02.003>
- Anisimova, S. I., Donchenko, H. V., Parkhomenko, I. M., & Kovalenko, V. M. (n.d.). [Mechanism of hepatoprotective action of methionine and composition "Metovitan" against a background of antituberculosis drug administration to rats]. *Ukrains'kyi Biokhimichni Zhurnal (1999)*, 85(2), 59–67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23808311>
- Bâ, A. (2008). Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 28(7), 923–31. <https://doi.org/10.1007/s10571-008-9297-7>
- Bâ, A. (2009). Alcohol and B1 vitamin deficiency-related stillbirths. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine : The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 22(5), 452–7. <https://doi.org/10.1080/14767050802609775>
- Bâ, A. (2011). Comparative effects of alcohol and thiamine deficiency on the developing central nervous system. *Behavioural Brain Research*, 225(1), 235–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.07.015>
- Bâ, A. (2012). Effects of thiamine deficiency on food intake and body weight increment in adult female and growing rats. *Behavioural Pharmacology*, 23(5–6), 575–81. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e32835724a1>
- Bâ, A. (2017). Alcohol and thiamine deficiency trigger differential mitochondrial transition pore opening mediating cellular death. *Apoptosis*, 22(6), 741–752. <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1372-4>
- Bai, P., Bennion, M., & Gubler, C. J. (1971). Biochemical factors involved in the anorexia of thiamin deficiency in rats. *The Journal of Nutrition*, 101(6), 731–7. <https://doi.org/10.1093/jn/101.6.731>
- Banka, S., de Goede, C., Yue, W. W., Morris, A. A. M., von Bremen, B., Chandler, K. E., ... Mayr, J. A. (2014). Expanding the clinical and molecular spectrum of thiamine pyrophosphokinase deficiency: a treatable neurological disorder caused by TPK1 mutations. *Molecular Genetics and Metabolism*, 113(4), 301–6. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.09.010>
- Bateman, R. J., Xiong, C., Benzinger, T. L. S., Fagan, A. M., Goate, A., Fox, N. C., ... Dominantly Inherited Alzheimer Network. (2012). Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 367(9), 795–804. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1202753>
- Bazarbachi, A., Muakkat, S., Ayas, M., Taher, A., Salem, Z., Solh, H., & Haidar, J. H. (1998). Thiamine-responsive myelodysplasia. *British Journal of Haematology*, 102(4), 1098–100. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9734663>

- Becker, J. T., Furman, J. M., Panisset, M., & Smith, C. (1990). Characteristics of the memory loss of a patient with Wernicke-Korsakoff's syndrome without alcoholism. *Neuropsychologia*, 28(2), 171–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2314572>
- Begley, T. P., Chatterjee, A., Hanes, J. W., Hazra, A., & Ealick, S. E. (2008). Cofactor biosynthesis--still yielding fascinating new biological chemistry. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(2), 118–25. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.02.006>
- Berman, K., & Fishman, R. A. (1975). Thiamine phosphate metabolism and possible coenzyme-independent functions of thiamine in brain. *Journal of Neurochemistry*, 24(3), 457–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/234518>
- Bettendorff, L. (1996). A non-cofactor role of thiamine derivatives in excitable cells? *Archives of Physiology and Biochemistry*, 104(6), 745–51. <https://doi.org/10.1076/apab.104.6.745.12916>
- Bettendorff, L., Kolb, H. A., & Schoffeniels, E. (1993). Thiamine triphosphate activates an anion channel of large unit conductance in neuroblastoma cells. *The Journal of Membrane Biology*, 136(3), 281–8. <https://doi.org/10.1007/BF00233667>
- Bettendorff, L., Mastrogiacomo, F., Kish, S. J., & Grisar, T. (1996). Thiamine, thiamine phosphates, and their metabolizing enzymes in human brain. *Journal of Neurochemistry*, 66(1), 250–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8522961>
- Bettendorff, L., Peeters, M., Wins, P., & Schoffeniels, E. (1993). Metabolism of thiamine triphosphate in rat brain: correlation with chloride permeability. *Journal of Neurochemistry*, 60(2), 423–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8380431>
- Bettendorff, L., Wins, P., & Lesourd, M. (1994). Subcellular localization and compartmentation of thiamine derivatives in rat brain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1222(1), 1–6.
- Binet, L., & Minz, B. (1936). Sur Les Réactions Biochimiques Du Nerf Au Repos Et Au Cours D'Une Excitation Électrique. *Archives Internationales de Physiologie*, 42(3), 281–300. <https://doi.org/10.3109/13813453609146174>
- Bisswanger, H. (1974). Regulatory properties of the pyruvate-dehydrogenase complex from *Escherichia coli*. Thiamine pyrophosphate as an effector. *European Journal of Biochemistry*, 48(2), 377–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4614975>
- Borgna-Pignatti, C., Azzalli, M., & Pedretti, S. (2009). Thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome:

- long term follow-up. *The Journal of Pediatrics*, 155(2), 295–7.
<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.01.062>
- Boros, L. G., Steinkamp, M. P., Fleming, J. C., Lee, W.-N. P., Cascante, M., & Neufeld, E. J. (2003). Defective RNA ribose synthesis in fibroblasts from patients with thiamine-responsive megaloblastic anemia (TRMA). *Blood*, 102(10), 3556–61. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1537>
- Boulware, M. J., Subramanian, V. S., Said, H. M., & Marchant, J. S. (2003). Polarized expression of members of the solute carrier SLC19A gene family of water-soluble multivitamin transporters: implications for physiological function. *The Biochemical Journal*, 376(Pt 1), 43–8. <https://doi.org/10.1042/BJ20031220>
- Brown, G. (2014). Defects of thiamine transport and metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37(4), 577–85. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9712-9>
- Bueno, K. O., de Souza Resende, L., Ribeiro, A. F., Dos Santos, D. M., Gonçalves, E. C., Vigil, F. A. B., ... Ribeiro, A. M. (2015). Spatial cognitive deficits in an animal model of Wernicke-Korsakoff syndrome are related to changes in thalamic VDAC protein concentrations. *Neuroscience*, 294, 29–37.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.03.001>
- Bull, C., Syed, W. A., Minter, S. C., & Bowers, M. S. (2015). Differential response of glial fibrillary acidic protein-positive astrocytes in the rat prefrontal cortex following ethanol self-administration. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 39(4), 650–8. <https://doi.org/10.1111/acer.12683>
- Bunik, V. I., Artiukhov, A., Kazantsev, A., Goncalves, R., Daloso, D., Oppermann, H., ... Gaunitz, F. (2015). Specific inhibition by synthetic analogs of pyruvate reveals that the pyruvate dehydrogenase reaction is essential for metabolism and viability of glioblastoma cells. *Oncotarget*, 6(37), 40036–52.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.5486>
- Butterworth, R. F. (1995). Pathophysiology of alcoholic brain damage: synergistic effects of ethanol, thiamine deficiency and alcoholic liver disease. *Metabolic Brain Disease*, 10(1), 1–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7596324>
- Butterworth, R. F. (2003a). Hepatic encephalopathy--a serious complication of alcoholic liver disease. *Alcohol Research & Health : The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 27(2), 143–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15303624>
- Butterworth, R. F. (2003b). Thiamin deficiency and brain disorders. *Nutrition Research Reviews*, 16(2), 277–84. <https://doi.org/10.1079/NRR200367>
- Butterworth, R. F., & Besnard, A. M. (1990). Thiamine-dependent enzyme changes in temporal cortex of

- patients with Alzheimer's disease. *Metabolic Brain Disease*, 5(4), 179–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2087217>
- Butterworth, R. F., Gaudreau, C., Vincelette, J., Bourgault, A. M., Lamothe, F., & Nutini, A. M. (1991). Thiamine deficiency and Wernicke's encephalopathy in AIDS. *Metabolic Brain Disease*, 6(4), 207–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1812394>
- Butterworth, R. F., & Héroux, M. (1989). Effect of pyridoxamine treatment and subsequent thiamine rehabilitation on regional cerebral amino acids and thiamine-dependent enzymes. *Journal of Neurochemistry*, 52(4), 1079–84.
- Calhau, C., Martel, F., Hipólito-Reis, C., & Azevedo, I. (2003). Effect of thiamine on 3H-MPP+ uptake by Caco-2 cells. *Pharmacological Research*, 48(6), 579–84.
- Calingasan, N. Y., Chun, W. J., Park, L. C., Uchida, K., & Gibson, G. E. (1999). Oxidative stress is associated with region-specific neuronal death during thiamine deficiency. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58(9), 946–58. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10499437>
- Calingasan, N. Y., Park, L. C., Calo, L. L., Trifiletti, R. R., Gandy, S. E., & Gibson, G. E. (1998). Induction of nitric oxide synthase and microglial responses precede selective cell death induced by chronic impairment of oxidative metabolism. *The American Journal of Pathology*, 153(2), 599–610. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65602-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65602-7)
- Casirola, D., Patrini, C., Ferrari, G., & Rindi, G. (1990). Thiamin transport by human erythrocytes and ghosts. *The Journal of Membrane Biology*, 118(1), 11–8.
- Ceccanti, M., Mancinelli, R., Sasso, G. F., Allen, J. P., Binetti, R., Mellini, A., ... Attilia, M. L. (n.d.). Erythrocyte thiamine (Th) esters: a major factor of the alcohol withdrawal syndrome or a candidate marker for alcoholism itself? *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 40(4), 283–90. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agh162>
- Chen, Q., Okada, S., & Okeda, R. (1997). Causality of parenchymal and vascular changes in rats with experimental thiamine deficiency encephalopathy. *Pathology International*, 47(11), 748–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9413033>
- Chen, Z., & Zhong, C. (2013). Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Progress in Neurobiology*, 108, 21–43. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.06.004>
- Cooper, J. R., & Pincus, J. H. (1979). The role of thiamine in nervous tissue. *Neurochemical Research*, 4(2),

- 223–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37452>
- Costantini, A., Pala, M. I., Compagnoni, L., & Colangeli, M. (2013). High-dose thiamine as initial treatment for Parkinson's disease. *BMJ Case Reports*, 2013. <https://doi.org/10.1136/bcr-2013-009289>
- Costantini, A., Pala, M. I., Grossi, E., Mondonico, S., Cardelli, L. E., Jenner, C., ... Fancellu, R. (2015). Long-Term Treatment with High-Dose Thiamine in Parkinson Disease: An Open-Label Pilot Study. *Journal of Alternative and Complementary Medicine (New York, N.Y.)*, 21(12), 740–7. <https://doi.org/10.1089/acm.2014.0353>
- Cullen, K. M., & Halliday, G. M. (1995). Mechanisms of cell death in cholinergic basal forebrain neurons in chronic alcoholics. *Metabolic Brain Disease*, 10(1), 81–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7596331>
- Dakshinamurti, K. (2005). Biotin--a regulator of gene expression. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(7), 419–23. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.03.015>
- Dalçık, H., Yardimoglu, M., Filiz, S., Gonca, S., Dalçık, C., & Erden, B. F. (2009). Chronic ethanol-induced glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity: an immunocytochemical observation in various regions of adult rat brain. *The International Journal of Neuroscience*, 119(9), 1303–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19922358>
- de la Monte, S. M., & Kril, J. J. (2014). Human alcohol-related neuropathology. *Acta Neuropathologica*, 127(1), 71–90. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1233-3>
- Deus, B., & Blum, H. (1970). Subcellular distribution of thiamine pyrophosphokinase activity in rat liver and erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 219(2), 489–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4322300>
- Dolce, V., Fiermonte, G., Runswick, M. J., Palmieri, F., & Walker, J. E. (2001). The human mitochondrial deoxynucleotide carrier and its role in the toxicity of nucleoside antivirals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), 2284–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.031430998>
- Dutta, B., Huang, W., Molero, M., Kekuda, R., Leibach, F. H., Devoe, L. D., ... Prasad, P. D. (1999). Cloning of the human thiamine transporter, a member of the folate transporter family. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(45), 31925–9.
- Eder, L., Hirt, L., & Dunant, Y. (1976). Possible involvement of thiamine in acetylcholine release. *Nature*, 264(5582), 186–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/186719>

- Enomoto, K., & Edwards, C. (1985). Thiamine blockade of neuromuscular transmission. *Brain Research*, 358(1–2), 316–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2416387>
- Feigin, V. L., Abajobir, A. A., Abate, K. H., Abd-Allah, F., Abdulle, A. M., Abera, S. F., ... Vos, T. (2017). Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet Neurology*, 16(11), 877–897. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30299-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30299-5)
- Ferguson, M., Dalve-Endres, A. M., McRee, R. C., & Langlais, P. J. (1999). Increased mast cell degranulation within thalamus in early pre-lesion stages of an experimental model of Wernicke's encephalopathy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58(7), 773–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10411347>
- Fernandes, L. M. P., Bezerra, F. R., Monteiro, M. C., Silva, M. L., de Oliveira, F. R., Lima, R. R., ... Maia, C. S. F. (2017). Thiamine deficiency, oxidative metabolic pathways and ethanol-induced neurotoxicity: how poor nutrition contributes to the alcoholic syndrome, as Marchiafava-Bignami disease. *European Journal of Clinical Nutrition*, 71(5), 580–586. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2016.267>
- Ferreira-Vieira, T. H., de Freitas-Silva, D. M., Ribeiro, A. F., Pereira, S. R. C., & Ribeiro, Â. M. (2016). Perinatal thiamine restriction affects central GABA and glutamate concentrations and motor behavior of adult rat offspring. *Neuroscience Letters*, 617, 182–7. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.01.060>
- Frijlink, D. W., Tilanus, J. J., & Roks, G. (2012). Elevated cerebrospinal fluid tau in Wernicke encephalopathy. *BMJ Case Reports*, 2012. <https://doi.org/10.1136/bcr-2012-006661>
- Ganapathy, V., Smith, S. B., & Prasad, P. D. (2004). SLC19: the folate/thiamine transporter family. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, 447(5), 641–6. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1068-1>
- Gangolf, M., Wins, P., Thiry, M., El Moualij, B., & Bettendorff, L. (2010). Thiamine triphosphate synthesis in rat brain occurs in mitochondria and is coupled to the respiratory chain. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(1), 583–94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.054379>
- Gaüzère, B. A., & Aubry, P. (n.d.). [The disease called “Barbiers” in the 19th century]. *Medecine et Sante Tropicales*, 24(3), 241–6. <https://doi.org/10.1684/mst.2014.0377>
- Gerards, M., Kamps, R., van Oevelen, J., Boesten, I., Jongen, E., de Koning, B., ... Smeets, H. (2013). Exome sequencing reveals a novel Moroccan founder mutation in SLC19A3 as a new cause of early-childhood fatal Leigh syndrome. *Brain : A Journal of Neurology*, 136(Pt 3), 882–90. <https://doi.org/10.1093/brain/awt013>

- Gibson, G. E., & Blass, J. P. (2007). Thiamine-dependent processes and treatment strategies in neurodegeneration. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(10), 1605–19. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1766>
- Gibson, G. E., Hirsch, J. A., Fonzetti, P., Jordan, B. D., Cirio, R. T., & Elder, J. (2016). Vitamin B1 (thiamine) and dementia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1367(1), 21–30. <https://doi.org/10.1111/nyas.13031>
- Gibson, G. E., Karuppagounder, S. S., & Shi, Q. (2008). Oxidant-induced changes in mitochondria and calcium dynamics in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147, 221–32. <https://doi.org/10.1196/annals.1427.038>
- Gibson, G. E., & Zhang, H. (2002). Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration. *Neurochemistry International*, 40(6), 493–504. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11850106>
- Gold, G., Kövari, E., Herrmann, F. R., Canuto, A., Hof, P. R., Michel, J.-P., ... Giannakopoulos, P. (2005). Cognitive consequences of thalamic, basal ganglia, and deep white matter lacunes in brain aging and dementia. *Stroke*, 36(6), 1184–8. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000166052.89772.b5>
- Gold, M., Hauser, R. A., & Chen, M. F. (1998). Plasma thiamine deficiency associated with Alzheimer's disease but not Parkinson's disease. *Metabolic Brain Disease*, 13(1), 43–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9570639>
- Guerri, C., & Renau-Piqueras, J. (1997). Alcohol, astroglia, and brain development. *Molecular Neurobiology*, 15(1), 65–81. <https://doi.org/10.1007/BF02740616>
- Guitart, X., Lumeng, L., Li, T. K., & Nestler, E. J. (1993). Alcohol-preferring and nonpreferring rats display different levels of neurofilament proteins in the ventral tegmental area. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 17(3), 580–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8101433>
- Haas, R. H. (1988). Thiamin and the brain. *Annual Review of Nutrition*, 8, 483–515. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.08.070188.002411>
- Harper, C. (n.d.). The neuropathology of alcohol-related brain damage. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 44(2), 136–40. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agn102>
- Harper, C. G., Giles, M., & Finlay-Jones, R. (1986). Clinical signs in the Wernicke-Korsakoff complex: a retrospective analysis of 131 cases diagnosed at necropsy. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 49(4), 341–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3701343>

- Hazell, A. S. (n.d.). Astrocytes are a major target in thiamine deficiency and Wernicke's encephalopathy. *Neurochemistry International*, 55(1–3), 129–35. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.02.020>
- Hazell, A. S., & Butterworth, R. F. (n.d.). Update of cell damage mechanisms in thiamine deficiency: focus on oxidative stress, excitotoxicity and inflammation. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 44(2), 141–7. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agn120>
- Hazell, A. S., Pannunzio, P., Rama Rao, K. V, Pow, D. V, & Rambaldi, A. (2003). Thiamine deficiency results in downregulation of the GLAST glutamate transporter in cultured astrocytes. *Glia*, 43(2), 175–84. <https://doi.org/10.1002/glia.10241>
- Hazell, A. S., Rao, K. V, Danbolt, N. C., Pow, D. V, & Butterworth, R. F. (2001). Selective down-regulation of the astrocyte glutamate transporters GLT-1 and GLAST within the medial thalamus in experimental Wernicke's encephalopathy. *Journal of Neurochemistry*, 78(3), 560–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483659>
- Hazell, A. S., & Wang, D. (2011). Identification of complexin II in astrocytes: a possible regulator of glutamate release in these cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 404(1), 228–32. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.11.098>
- Heap, L. C., Pratt, O. E., Ward, R. J., Waller, S., Thomson, A. D., Shaw, G. K., & Peters, T. J. (2002). Individual susceptibility to Wernicke-Korsakoff syndrome and alcoholism-induced cognitive deficit: impaired thiamine utilization found in alcoholics and alcohol abusers. *Psychiatric Genetics*, 12(4), 217–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12454526>
- Huang, W., Qin, J., Liu, D., Wang, Y., Shen, X., Yang, N., ... Jia, D. (2018). Reduced thiamine binding is a novel mechanism for TPK deficiency disorder. *Molecular Genetics and Genomics : MGG*. <https://doi.org/10.1007/s00438-018-1517-3>
- Itokawa, Y. (1996). Thiamine and nervous system function: an historical sketch. *Metabolic Brain Disease*, 11(1), 1–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8815387>
- Jhala, S. S., & Hazell, A. S. (2011). Modeling neurodegenerative disease pathophysiology in thiamine deficiency: consequences of impaired oxidative metabolism. *Neurochemistry International*, 58(3), 248–60. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.11.019>
- Ji, Z., Fan, Z., Zhang, Y., Yu, R., Yang, H., Zhou, C., ... Ke, Z.-J. (2014). Thiamine deficiency promotes T cell infiltration in experimental autoimmune encephalomyelitis: the involvement of CCL2. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 193(5), 2157–67. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302702>

- Jiménez-Jiménez, F. J., Molina, J. A., Hernánz, A., Fernández-Vivancos, E., de Bustos, F., Barcenilla, B., ... Villanueva, C. (1999). Cerebrospinal fluid levels of thiamine in patients with Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 271(1), 33–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471207>
- Kang, J., & Samuels, D. C. (2008). The evidence that the DNC (SLC25A19) is not the mitochondrial deoxyribonucleotide carrier. *Mitochondrion*, 8(2), 103–8. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2008.01.001>
- Kartal, B., & Palabiyik, B. (2019). Thiamine leads to oxidative stress resistance via regulation of the glucose metabolism. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, 65(1), 73–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30782298>
- Karuppagounder, S. S., Xu, H., Shi, Q., Chen, L. H., Pedrini, S., Pechman, D., ... Gibson, G. E. (2009). Thiamine deficiency induces oxidative stress and exacerbates the plaque pathology in Alzheimer's mouse model. *Neurobiology of Aging*, 30(10), 1587–600. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.12.013>
- Kattah, J. C., Tehrani, A. S., du Lac, S., Newman-Toker, D. E., & Zee, D. S. (2018). Conversion of upbeat to downbeat nystagmus in Wernicke encephalopathy. *Neurology*, 91(17), 790–796. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006385>
- Ke, Z.-J., DeGiorgio, L. A., Volpe, B. T., & Gibson, G. E. (2003). Reversal of thiamine deficiency-induced neurodegeneration. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 62(2), 195–207. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12578229>
- Ke, Z.-J., Wang, X., Fan, Z., & Luo, J. (2009). Ethanol Promotes Thiamine Deficiency-Induced Neuronal Death: Involvement of Double-Stranded RNA-activated Protein Kinase. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 33(6), 1097–1103. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2009.00931.x>
- Kevelam, S. H., Bugiani, M., Salomons, G. S., Feigenbaum, A., Blaser, S., Prasad, C., ... van der Knaap, M. S. (2013). Exome sequencing reveals mutated SLC19A3 in patients with an early-infantile, lethal encephalopathy. *Brain : A Journal of Neurology*, 136(Pt 5), 1534–43. <https://doi.org/10.1093/brain/awt054>
- Klooster, A., Larkin, J. R., Wiersema-Buist, J., Gans, R. O. B., Thornalley, P. J., Navis, G., ... Bakker, S. J. L. (2013). Are brain and heart tissue prone to the development of thiamine deficiency? *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 47(3), 215–21. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2012.12.014>
- Kloss, O., Eskin, N. A. M., & Suh, M. (2018). Thiamin deficiency on fetal brain development with and without prenatal alcohol exposure. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 96(2), 169–177. <https://doi.org/10.1139/bcb-2017-0082>

- Kokunin, V. A. (n.d.). Statistical processing of data from a small number of experiments. *Ukrains'kyi Biokhimichnyi Zhurnal*, 47(6), 776–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1202714>
- Kulinskii, V. I., & Kolesnichenko, L. S. (n.d.). [Nuclear glutathione and its functions]. *Biomeditsinskaia Khimiia*, 56(6), 657–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21395068>
- KUNZ, H. A. (1956). [Effect of aneurin antimetabolites on a single labeled nerve fiber]. *Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta*, 14(4), 411–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13405362>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>
- Laforenza, U., Patrini, C., Gastaldi, G., & Rindi, G. (1990). Effects of acute and chronic ethanol administration on thiamine metabolizing enzymes in some brain areas and in other organs of the rat. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 25(6), 591–603. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1964780>
- Laforenza, U., Patrini, C., Poloni, M., Mazzarello, P., Ceroni, M., Gajdusek, D. C., & Garruto, R. M. (1992). Thiamin mono- and pyrophosphatase activities from brain homogenate of Guamanian amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia patients. *Journal of the Neurological Sciences*, 109(2), 156–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1321889>
- Lakaye, B., Wirtzfeld, B., Wins, P., Grisar, T., & Bettendorff, L. (2004). Thiamine triphosphate, a new signal required for optimal growth of *Escherichia coli* during amino acid starvation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17142–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313569200>
- Langlais, P. J., Anderson, G., Guo, S. X., & Bondy, S. C. (1997). Increased cerebral free radical production during thiamine deficiency. *Metabolic Brain Disease*, 12(2), 137–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9203158>
- Latt, N., & Dore, G. (2014). Thiamine in the treatment of Wernicke encephalopathy in patients with alcohol use disorders. *Internal Medicine Journal*, 44(9), 911–5. <https://doi.org/10.1111/imj.12522>
- Leevy, C. M. (1982). Thiamin deficiency and alcoholism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 378, 316–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7044226>
- Lemos, C., Faria, A., Meireles, M., Martel, F., Monteiro, R., & Calhau, C. (2012). Thiamine is a substrate of organic cation transporters in Caco-2 cells. *European Journal of Pharmacology*, 682(1–3), 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.02.028>

- Liu, H., Sang, S., Lu, Y., Wang, Z., Yu, X., & Zhong, C. (2017). Thiamine metabolism is critical for regulating correlated growth of dendrite arbors and neuronal somata. *Scientific Reports*, 7(1), 5342. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05476-w>
- Liu, J.-Y., Timm, D. E., & Hurley, T. D. (2006a). Pyriithiamine as a substrate for thiamine pyrophosphokinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(10), 6601–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510951200>
- Liu, J.-Y., Timm, D. E., & Hurley, T. D. (2006b). Pyriithiamine as a substrate for thiamine pyrophosphokinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(10), 6601–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510951200>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lonsdale, D. (2006). A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, 3(1), 49–59. <https://doi.org/10.1093/ecam/nek009>
- Lorber, A., Gazit, A. Z., Khoury, A., Schwartz, Y., & Mandel, H. (n.d.). Cardiac manifestations in thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome. *Pediatric Cardiology*, 24(5), 476–81. <https://doi.org/10.1007/s00246-002-0215-3>
- Losa, R., Sierra, M. I., Fernández, A., Blanco, D., & Buesa, J. M. (2005). Determination of thiamine and its phosphorylated forms in human plasma, erythrocytes and urine by HPLC and fluorescence detection: a preliminary study on cancer patients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37(5), 1025–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.08.038>
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>
- Lu’o’ng, K. vinh quốc, & Nguyễn, L. T. H. (2012). Thiamine and Parkinson’s disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 316(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.02.008>
- Lumeng, L., Edmondson, J. W., Schenker, S., & Li, T. K. (1979). Transport and metabolism of thiamin in isolated rat hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(15), 7265–8.
- Luong, K. V. Q., & Nguyễn, L. T. H. (2013). The beneficial role of thiamine in Parkinson disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 19(7), 461–8. <https://doi.org/10.1111/cns.12078>
- Manzetti, S., Zhang, J., & van der Spoel, D. (2014). Thiamin function, metabolism, uptake, and transport.

- Biochemistry*, 53(5), 821–35. <https://doi.org/10.1021/bi401618y>
- Mastrogiacoma, F., Bettendorff, L., Grisar, T., & Kish, S. J. (1996). Brain thiamine, its phosphate esters, and its metabolizing enzymes in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 39(5), 585–91. <https://doi.org/10.1002/ana.410390507>
- Matherly, L. H., & Goldman, D. I. (2003). Membrane transport of folates. *Vitamins and Hormones*, 66, 403–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12852262>
- Matsuda, T., Yabushita, Y., Doi, T., & Iwata, H. (1985). Regional distribution of thiamin pyrophosphokinase in rat brain. *Experientia*, 41(7), 924–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2988999>
- Mayr, J. A., Freisinger, P., Schlachter, K., Rolinski, B., Zimmermann, F. A., Scheffner, T., ... Sperl, W. (2011). Thiamine pyrophosphokinase deficiency in encephalopathic children with defects in the pyruvate oxidation pathway. *American Journal of Human Genetics*, 89(6), 806–12. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.11.007>
- Meador, K., Loring, D., Nichols, M., Zamrini, E., Rivner, M., Posas, H., ... Moore, E. (n.d.). Preliminary findings of high-dose thiamine in dementia of Alzheimer's type. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 6(4), 222–9. <https://doi.org/10.1177/089198879300600408>
- Mehta, A. J. (2016). Alcoholism and critical illness: A review. *World Journal of Critical Care Medicine*, 5(1), 27–35. <https://doi.org/10.5492/wjccm.v5.i1.27>
- Miguel-Hidalgo, J. J. (2005). Lower packing density of glial fibrillary acidic protein-immunoreactive astrocytes in the prelimbic cortex of alcohol-naive and alcohol-drinking alcohol-preferring rats as compared with alcohol-nonpreferring and Wistar rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 29(5), 766–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15897721>
- Miguel-Hidalgo, J. J., Overholser, J. C., Meltzer, H. Y., Stockmeier, C. A., & Rajkowska, G. (2006). Reduced glial and neuronal packing density in the orbitofrontal cortex in alcohol dependence and its relationship with suicide and duration of alcohol dependence. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 30(11), 1845–55. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00221.x>
- Mimori, Y., Katsuoka, H., & Nakamura, S. (1996). Thiamine therapy in Alzheimer's disease. *Metabolic Brain Disease*, 11(1), 89–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8815393>
- Miranda-Ríos, J. (2007). The THI-box riboswitch, or how RNA binds thiamin pyrophosphate. *Structure (London, England : 1993)*, 15(3), 259–65. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.02.001>
- Mitsuda, H., Takii, Y., Iwami, K., & Yasumoto, K. (1975). Purification and properties of thiamine

- pyrophosphokinase from parsely leaf. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 21(2), 103–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/239105>
- Mizuno, Y., Matuda, S., Yoshino, H., Mori, H., Hattori, N., & Ikebe, S. (1994). An immunohistochemical study on alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 35(2), 204–10. <https://doi.org/10.1002/ana.410350212>
- Mosconi, L. (2005). Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 32(4), 486–510. <https://doi.org/10.1007/s00259-005-1762-7>
- Mosconi, L., Pupi, A., & De Leon, M. J. (2008). Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147, 180–95. <https://doi.org/10.1196/annals.1427.007>
- Mosconi, L., Sorbi, S., de Leon, M. J., Li, Y., Nacmias, B., Myoung, P. S., ... Pupi, A. (2006). Hypometabolism exceeds atrophy in presymptomatic early-onset familial Alzheimer's disease. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 47(11), 1778–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17079810>
- Mouton-Liger, F., Rebillat, A.-S., Gourmaud, S., Paquet, C., Leguen, A., Dumurgier, J., ... Hugon, J. (2015). PKR downregulation prevents neurodegeneration and β -amyloid production in a thiamine-deficient model. *Cell Death & Disease*, 6, e1594. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.552>
- Mulholland, P. J. (2006). Susceptibility of the cerebellum to thiamine deficiency. *Cerebellum (London, England)*, 5(1), 55–63. <https://doi.org/10.1080/14734220600551707>
- Mulholland, P. J., Self, R. L., Stepanyan, T. D., Little, H. J., Littleton, J. M., & Prendergast, M. A. (2005). Thiamine deficiency in the pathogenesis of chronic ethanol-associated cerebellar damage in vitro. *Neuroscience*, 135(4), 1129–39. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.077>
- Murai, A., & Katsura, E. (1975). Thiamine triphosphatase activity of myosin and accelerating effect of thiamine di- and tri-phosphates on superprecipitation of actomyosin. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 21(3), 169–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1481>
- Nabokina, S. M., & Said, H. M. (2012). A high-affinity and specific carrier-mediated mechanism for uptake of thiamine pyrophosphate by human colonic epithelial cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 303(3), G389-95. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00151.2012>
- Nakagawasai, O. (2005). Behavioral and neurochemical alterations following thiamine deficiency in rodents:

- relationship to functions of cholinergic neurons. *Yakugaku Zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 125(7), 549–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15997211>
- Nauti, A., Patrini, C., Reggiani, C., Merighi, A., Bellazzi, R., & Rindi, G. (1997). In vivo study of the kinetics of thiamine and its phosphoesters in the deafferented rat cerebellum. *Metabolic Brain Disease*, 12(2), 145–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9203159>
- Neufeld, E. J., Fleming, J. C., Tartaglino, E., & Steinkamp, M. P. (n.d.). Thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome: a disorder of high-affinity thiamine transport. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 27(1), 135–8. <https://doi.org/10.1006/bcmd.2000.0356>
- Nghiêm, H. O., Bettendorff, L., & Changeux, J. P. (2000). Specific phosphorylation of Torpedo 43K rapsyn by endogenous kinase(s) with thiamine triphosphate as the phosphate donor. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14(3), 543–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10698970>
- Nolan, K. A., Black, R. S., Sheu, K. F., Langberg, J., & Blass, J. P. (1991). A trial of thiamine in Alzheimer's disease. *Archives of Neurology*, 48(1), 81–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1986730>
- Nosaka, K., Onozuka, M., Kakazu, N., Hibi, S., Nishimura, H., Nishino, H., & Abe, T. (2001). Isolation and characterization of a human thiamine pyrophosphokinase cDNA. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1517(2), 293–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11342111>
- Nunes, P. T., Gómez-Mendoza, D. P., Rezende, C. P., Figueiredo, H. C. P., & Ribeiro, A. M. (2018). Thalamic Proteome Changes and Behavioral Impairments in Thiamine-deficient Rats. *Neuroscience*, 385, 181–197. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.06.003>
- Onozuka, M., & Nosaka, K. (2003). Steady-state kinetics and mutational studies of recombinant human thiamin pyrophosphokinase. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 49(3), 156–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12953792>
- Oshima, Y. (1997). The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Genetic Systems*, 72(6), 323–34.
- Oyinbo, C. A., Igbigbi, P. S., & Avwioro, G. O. (2016). Landolphia owariensis Attenuates Alcohol-induced Cerebellar Neurodegeneration: Significance of Neurofilament Protein Alteration in the Purkinje Cells. *Folia Medica*, 58(4), 241–249. <https://doi.org/10.1515/folmed-2016-0034>
- Pácal, L., Kuricová, K., & Kaňková, K. (2014). Evidence for altered thiamine metabolism in diabetes: Is there a

- potential to oppose gluco- and lipotoxicity by rational supplementation? *World Journal of Diabetes*, 5(3), 288–95. <https://doi.org/10.4239/wjd.v5.i3.288>
- Pan, X., Fei, G., Lu, J., Jin, L., Pan, S., Chen, Z., ... Zhong, C. (2016). Measurement of Blood Thiamine Metabolites for Alzheimer's Disease Diagnosis. *EBioMedicine*, 3, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.11.039>
- Pan, X., Gong, N., Zhao, J., Yu, Z., Gu, F., Chen, J., ... Xu, T.-L. (2010). Powerful beneficial effects of benfotiamine on cognitive impairment and beta-amyloid deposition in amyloid precursor protein/presenilin-1 transgenic mice. *Brain : A Journal of Neurology*, 133(Pt 5), 1342–51. <https://doi.org/10.1093/brain/awq069>
- Pannunzio, P., Hazell, A. S., Pannunzio, M., Rao, K. V., & Butterworth, R. F. (2000). Thiamine deficiency results in metabolic acidosis and energy failure in cerebellar granule cells: an in vitro model for the study of cell death mechanisms in Wernicke's encephalopathy. *Journal of Neuroscience Research*, 62(2), 286–92. [https://doi.org/10.1002/1097-4547\(20001015\)62:2<286::AID-JNR13>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1097-4547(20001015)62:2<286::AID-JNR13>3.0.CO;2-0)
- Parkhomenko, I. M., Donchenko, G. V., & Protasova, Z. S. (n.d.). [The neural activity of thiamine: facts and hypotheses]. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal* (1978), 68(2), 3–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9005657>
- Parkhomenko, I. M., Pilipchuk, S. I., Sidorova, A. A., Stepanenko, S. P., Chekhovskaia, L. I., & Donchenko, G. V. (n.d.). [Thiamine metabolism disorders in the rat brain in experimental alcoholism and a possibility of their correction by vitamin E]. *Ukrains'kyi Biokhimichnyi Zhurnal* (1999), 80(4), 96–104. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19140455>
- Parkhomenko, I. M., Stepuro, I. I., Donchenko, G. V., & Stepuro, V. I. (n.d.). [Oxidized derivatives of thiamine: formation, properties, biological role]. *Ukrains'kyi Biokhimichnyi Zhurnal* (1999), 84(6), 5–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23387265>
- Parkhomenko, Y. M., Donchenko, G. V., Chornyi, S. A., Yanchiy, O. R., Strokina, A. O., Stepanenko, S. P., ... Pogorelaya, N. K. (2014). Thiamine Metabolism in Neurons and Their Vital Capacity Upon the Action of Ethanol and Acetaldehyde. *Neurophysiology*, 46(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11062-014-9399-4>
- Parkhomenko, Y. M., Kudryavtsev, P. A., Pylypchuk, S. Y., Chekhivska, L. I., Stepanenko, S. P., Sergiichuk, A. A., & Bunik, V. I. (2011). Chronic alcoholism in rats induces a compensatory response, preserving brain thiamine diphosphate, but the brain 2-oxo acid dehydrogenases are inactivated despite unchanged coenzyme levels. *Journal of Neurochemistry*, 117(6), 1055–65. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07283.x>

- Parkhomenko, Y. M., Pavlova, A. S., & Mezhenkaya, O. A. (2016). Mechanisms Responsible for the High Sensitivity of Neural Cells to Vitamin B1 Deficiency. *Neurophysiology*, 48(6), 429–448. <https://doi.org/10.1007/s11062-017-9620-3>
- Patrini, C., Nauti, A., & Rindi, G. (1998). Thiamine pyrophosphate-dependent and thiamine metabolizing enzymes in the deafferented cerebellum and in the intact cerebral cortex of rat. *Metabolic Brain Disease*, 13(1), 21–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9570637>
- Pavlova, A. S., Stepanenko, S. P., Chekhovskaya, L. I., Tikhomirov, A. A., & Parkhomenko, Y. M. (2016). Dependence of Vitamin B1 Metabolism and the State of Astroglia in the Rat Brain on the Supply with this Vitamin. *Neurophysiology*, 48(5), 336–345. <https://doi.org/10.1007/s11062-017-9607-0>
- Pekny, M., Pekna, M., Messing, A., Steinhäuser, C., Lee, J.-M., Parpura, V., ... Verkhratsky, A. (2016). Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathologica*, 131(3), 323–45. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1513-1>
- Perri, V., Sacchi, O., & Casella, C. (1970). Action of oxythiamine and pyriethamine on the isolated rat superior cervical ganglion. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences*, 55(1), 36–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5202921>
- PETROPULOS, S. F. (1960). The action of an antimetabolite of thiamine on single myelinated nerve fibers. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 56, 7–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13734933>
- Petrovic, M. M., Scepanovic, L., Rosic, G., & Mitrovic, D. M. (2008). Properties of thiamine transport in isolated perfused hearts of chronically alcoholic guinea pigs. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 86(4), 160–5. <https://doi.org/10.1139/Y08-013>
- Polegato, B. F., Pereira, A. G., Azevedo, P. S., Costa, N. A., Zornoff, L. A. M., Paiva, S. A. R., & Minicucci, M. F. (2019). Role of Thiamin in Health and Disease. *Nutrition in Clinical Practice : Official Publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*. <https://doi.org/10.1002/ncp.10234>
- Protasova, Z. S., Parkhomenko, I. M., Donchenko, G. V., & Churilova, T. I. (n.d.). [Interaction of thiamine with rat brain synaptosomes]. *Ukrains'kyi Biokhimichni Zhurnal (1999)*, 71(4), 50–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10791057>
- Qin, L., & Crews, F. T. (2014). Focal thalamic degeneration from ethanol and thiamine deficiency is associated with neuroimmune gene induction, microglial activation, and lack of monocarboxylic acid transporters. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 38(3), 657–71. <https://doi.org/10.1111/acer.12272>

- Rajgopal, A., Edmondson, A., Goldman, I. D., & Zhao, R. (2001). SLC19A3 encodes a second thiamine transporter ThTr2. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1537(3), 175–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731220>
- Rao, V. L., Richardson, J. S., & Butterworth, R. F. (1993). Decreased activities of thiamine diphosphatase in frontal and temporal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 631(2), 334–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8131063>
- Reed, L. J. (1981). Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by a phosphorylation-dephosphorylation cycle. *Current Topics in Cellular Regulation*, 18, 95–106. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7273851>
- Rees, E., & Gowing, L. R. (n.d.). Supplementary thiamine is still important in alcohol dependence. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 48(1), 88–92. <https://doi.org/10.1093/alcalc/ags120>
- Reis, K. P., Heimfarth, L., Pierozan, P., Ferreira, F., Loureiro, S. O., Fernandes, C. G., ... Pessoa-Pureur, R. (2015). High postnatal susceptibility of hippocampal cytoskeleton in response to ethanol exposure during pregnancy and lactation. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 49(7), 665–74. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2015.06.005>
- Resende, L. S., Ribeiro, A. M., Werner, D., Hall, J. M., & Savage, L. M. (2012). Thiamine deficiency degrades the link between spatial behavior and hippocampal synapsin I and phosphorylated synapsin I protein levels. *Behavioural Brain Research*, 232(2), 421–5. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.04.004>
- Ricketts, C. J., Minton, J. A., Samuel, J., Ariyawansa, I., Wales, J. K., Lo, I. F., & Barrett, T. G. (2006). Thiamine-responsive megaloblastic anaemia syndrome: long-term follow-up and mutation analysis of seven families. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, 95(1), 99–104. <https://doi.org/10.1080/08035250500323715>
- Rindi, G. (1989). Alcohol and thiamine of the brain. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 24(6), 493–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2560632>
- Rindi, G., Comincioli, V., Reggiani, C., & Patrini, C. (1987). Nervous tissue thiamine metabolism in vivo. III. Influence of ethanol intake on the dynamics of thiamine and its phosphoesters in different brain regions and sciatic nerve of the rat. *Brain Research*, 413(1), 23–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3594257>
- Rindi, G., & Laforenza, U. (2000). Thiamine intestinal transport and related issues: recent aspects. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 224(4), 246–55.

- Rindi, G., Patrini, C., Nauti, A., Bellazzi, R., & Magni, P. (2003). Three thiamine analogues differently alter thiamine transport and metabolism in nervous tissue: an in vivo kinetic study using rats. *Metabolic Brain Disease*, 18(4), 245–63.
- Rist, R. J., Romero, I. A., Chan, M. W., Couraud, P. O., Roux, F., & Abbott, N. J. (1997). F-actin cytoskeleton and sucrose permeability of immortalised rat brain microvascular endothelial cell monolayers: effects of cyclic AMP and astrocytic factors. *Brain Research*, 768(1–2), 10–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9369295>
- Rodionov, D. A., Hebbeln, P., Eudes, A., ter Beek, J., Rodionova, I. A., Erkens, G. B., ... Eitinger, T. (2009). A novel class of modular transporters for vitamins in prokaryotes. *Journal of Bacteriology*, 191(1), 42–51. <https://doi.org/10.1128/JB.01208-08>
- Rodionov, D. A., Vitreschak, A. G., Mironov, A. A., & Gelfand, M. S. (2002). Comparative genomics of thiamin biosynthesis in procaryotes. New genes and regulatory mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(50), 48949–59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208965200>
- Rodriguez-Melendez, R., & Zemleni, J. (2003). Regulation of gene expression by biotin (review). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14(12), 680–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14690760>
- Roecklein, B., Levin, S. W., Comly, M., & Mukherjee, A. B. (1985). Intrauterine growth retardation induced by thiamine deficiency and pyriothiamine during pregnancy in the rat. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 151(4), 455–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3976746>
- Rogers, E. F. (1982). General discussion of antithiamin compounds and thiamin antagonists. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 378, 157–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6952782>
- Rosenberg, M. J., Agarwala, R., Bouffard, G., Davis, J., Fiermonte, G., Hilliard, M. S., ... Biesecker, L. G. (2002). Mutant deoxynucleotide carrier is associated with congenital microcephaly. *Nature Genetics*, 32(1), 175–9. <https://doi.org/10.1038/ng948>
- Rozanov, V. A., & Parkhomenko, I. M. (n.d.). [Activity of pyruvate- and ketoglutarate dehydrogenase complexes on various regions of the rat brain]. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal (1978)*, 59(1), 29–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3810887>
- Sabui, S., Subramanian, V. S., Kapadia, R., & Said, H. M. (2017). Adaptive regulation of pancreatic acinar mitochondrial thiamin pyrophosphate uptake process: possible involvement of epigenetic mechanism(s). *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 313(5), G448–

G455. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00192.2017>

- Said, H. M., Balamurugan, K., Subramanian, V. S., & Marchant, J. S. (2004). Expression and functional contribution of hTHTR-2 in thiamin absorption in human intestine. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286(3), G491-8. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00361.2003>
- Saini, M., Lin, W., Kang, C., & Umapathi, T. (2018). Acute flaccid paralysis: Do not forget beriberi neuropathy. *Journal of the Peripheral Nervous System : JPNS*. <https://doi.org/10.1111/jns.12297>
- Sanemori, H., & Kawasaki, T. (1980). Purification and properties of thiamine pyrophosphokinase in *Paracoccus denitrificans*. *Journal of Biochemistry*, 88(1), 223–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6251035>
- Sasa, M., Takemoto, I., Nishino, K., & Itokawa, Y. (1976). The role of thiamine on excitable membrane of crayfish giant axon. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 22 SUPPL, 21–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/978275>
- Sasaki, T., Kitagawa, K., Yagita, Y., Sugiura, S., Omura-Matsuoka, E., Tanaka, S., ... Hori, M. (2006). Bcl2 enhances survival of newborn neurons in the normal and ischemic hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*, 84(6), 1187–96. <https://doi.org/10.1002/jnr.21036>
- Saunders, D. E., DiCerbo, J. A., Williams, J. R., & Hannigan, J. H. (n.d.). Alcohol reduces neurofilament protein levels in primary cultured hippocampal neurons. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 14(5), 519–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9305469>
- Scharfe, C., Hauschild, M., Klopstock, T., Janssen, A. J., Heidemann, P. H., Meitinger, T., & Jaksch, M. (2000). A novel mutation in the thiamine responsive megaloblastic anaemia gene SLC19A2 in a patient with deficiency of respiratory chain complex I. *Journal of Medical Genetics*, 37(9), 669–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10978358>
- Severin SE, S. G. (1989). *Tutorial on Biochemistry*. Moskow: Izdatel'stvo MGU.
- Shangari, N., Depeint, F., Furrer, R., Bruce, W. R., & O'Brien, P. J. (2005). The effects of partial thiamin deficiency and oxidative stress (i.e., glyoxal and methylglyoxal) on the levels of alpha-oxoaldehyde plasma protein adducts in Fischer 344 rats. *FEBS Letters*, 579(25), 5596–602. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.027>
- Shangari, N., Mehta, R., & O'brien, P. J. (2007). Hepatocyte susceptibility to glyoxal is dependent on cell thiamin content. *Chemico-Biological Interactions*, 165(2), 146–54. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.11.009>

- Sharma, A., Bist, R., & Bubber, P. (2013). Thiamine deficiency induces oxidative stress in brain mitochondria of *Mus musculus*. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 69(3), 539–46.
<https://doi.org/10.1007/s13105-013-0242-y>
- Sherwood, C. C., Stimpson, C. D., Raghanti, M. A., Wildman, D. E., Uddin, M., Grossman, L. I., ... Hof, P. R. (2006). Evolution of increased glia-neuron ratios in the human frontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(37), 13606–11.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0605843103>
- Sheu, K. F., Clarke, D. D., Kim, Y. T., Blass, J. P., Harding, B. J., & DeCicco, J. (1988). Studies of transketolase abnormality in Alzheimer's disease. *Archives of Neurology*, 45(8), 841–5. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3395257>
- Singleton, C. K., & Martin, P. R. (2001). Molecular mechanisms of thiamine utilization. *Current Molecular Medicine*, 1(2), 197–207.
- Siu, V. M., Ratko, S., Prasad, A. N., Prasad, C., & Rupar, C. A. (2010). Amish microcephaly: Long-term survival and biochemical characterization. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 152A(7), 1747–51.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33373>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Song, X.-S., Huang, Z.-J., & Song, X.-J. (2009). Thiamine suppresses thermal hyperalgesia, inhibits hyperexcitability, and lessens alterations of sodium currents in injured, dorsal root ganglion neurons in rats. *Anesthesiology*, 110(2), 387–400. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181942f1e>
- Soukup, J. K., & Soukup, G. A. (2004). Riboswitches exert genetic control through metabolite-induced conformational change. *Current Opinion in Structural Biology*, 14(3), 344–9.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.04.007>
- Spiegel, R., Shaag, A., Edvardson, S., Mandel, H., Stepensky, P., Shalev, S. A., ... Elpeleg, O. (2009). SLC25A19 mutation as a cause of neuropathy and bilateral striatal necrosis. *Annals of Neurology*, 66(3), 419–24.
<https://doi.org/10.1002/ana.21752>
- Springer, R. (1962). Methoden der enzymatischen Analyse. Herausgegeben von H. U. Bergmeyer unter Mitarbeit von 115 Autoren. XXII, 1065 Seiten, 78 Abbildungen, 41 Tabellen, 4 Farbtafeln. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1962. Preis: Kunststoffeinband DM 99,—. *Archiv Der Pharmazie*, 295(11), 863–864.
<https://doi.org/10.1002/ardp.19622951116>

- Srinivasan, P., Subramanian, V. S., & Said, H. M. (2014). Mechanisms involved in the inhibitory effect of chronic alcohol exposure on pancreatic acinar thiamin uptake. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 306(7), G631-9. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00420.2013>
- Subramanian, V. S., Marchant, J. S., & Said, H. M. (2006). Biotin-responsive basal ganglia disease-linked mutations inhibit thiamine transport via hTHTR2: biotin is not a substrate for hTHTR2. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 291(5), C851-9. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00105.2006>
- Subramanian, V. S., Subramanya, S. B., Tsukamoto, H., & Said, H. M. (2010). Effect of chronic alcohol feeding on physiological and molecular parameters of renal thiamin transport. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 299(1), F28-34. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00140.2010>
- Subramanya, S. B., Subramanian, V. S., & Said, H. M. (2010). Chronic alcohol consumption and intestinal thiamin absorption: effects on physiological and molecular parameters of the uptake process. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(1), G23-31. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00132.2010>
- Tallaksen, C. M., Sande, A., Bøhmer, T., Bell, H., & Karlsen, J. (1993). Kinetics of thiamin and thiamin phosphate esters in human blood, plasma and urine after 50 mg intravenously or orally. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 44(1), 73-8.
- Tallaksen, C. M., & Taubøll, E. (2000). Excitatory effect of thiamin on CA1 pyramidal neurones in rat hippocampal slices in vitro. *European Journal of Neurology*, 7(6), 693-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11136357>
- Tanaka, C., Itokawa, Y., & Tanaka, S. (1973). The axoplasmic transport of thiamine in rat sciatic nerve. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 21(1), 81-6. <https://doi.org/10.1177/21.1.81>
- Thomson, A. D. (n.d.). Mechanisms of vitamin deficiency in chronic alcohol misusers and the development of the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire). Supplement*, 35(1), 2-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11304071>
- Toledo Nunes, P., Vedder, L. C., Deak, T., & Savage, L. M. (2019). A Pivotal Role for Thiamine Deficiency in the Expression of Neuroinflammation Markers in Models of Alcohol-Related Brain Damage. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. <https://doi.org/10.1111/acer.13946>
- Troncoso, J. C., Johnston, M. V., Hess, K. M., Griffin, J. W., & Price, D. L. (1981). Model of Wernicke's encephalopathy. *Archives of Neurology*, 38(6), 350-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7236062>

- Tumanov, V. N., & Trebukhina, R. V. (n.d.). [Interstitial thiamine redistribution during the development of vitamin B1 deficiency in mice]. *Voprosy Pitaniia*, (6), 49–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3439087>
- Udomuksorn, W., Mukem, S., Kumarnsit, E., Vongvatcharanon, S., & Vongvatcharanon, U. (2011). Effects of alcohol administration during adulthood on parvalbumin and glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the rat cerebral cortex. *Acta Histochemica*, 113(3), 283–9. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2009.11.001>
- Vetreno, R. P., Ramos, R. L., Anzalone, S., & Savage, L. M. (2012). Brain and behavioral pathology in an animal model of Wernicke's encephalopathy and Wernicke-Korsakoff Syndrome. *Brain Research*, 1436, 178–92. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.11.038>
- Vidhya, A., Renjugopal, V., & Indira, M. (n.d.). Impact of thiamine supplementation in the reversal of ethanol induced toxicity in rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 57(4), 406–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24968580>
- Vignisse, J., Sambon, M., Gorlova, A., Pavlov, D., Caron, N., Malgrange, B., ... Bettendorff, L. (2017). Thiamine and benfotiamine prevent stress-induced suppression of hippocampal neurogenesis in mice exposed to predation without affecting brain thiamine diphosphate levels. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 82, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.05.005>
- Vitreschak, A. G., Rodionov, D. A., Mironov, A. A., & Gelfand, M. S. (2004). Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? *Trends in Genetics : TIG*, 20(1), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.11.008>
- Vlasova, T. I., Stratton, S. L., Wells, A. M., Mock, N. I., & Mock, D. M. (2005). Biotin deficiency reduces expression of SLC19A3, a potential biotin transporter, in leukocytes from human blood. *The Journal of Nutrition*, 135(1), 42–7. <https://doi.org/10.1093/jn/135.1.42>
- Wang, D., & Hazell, A. S. (2010). Microglial activation is a major contributor to neurologic dysfunction in thiamine deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 402(1), 123–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.09.128>
- Wang, Z.-B., Gan, Q., Rupert, R. L., Zeng, Y.-M., & Song, X.-J. (2005). Thiamine, pyridoxine, cyanocobalamin and their combination inhibit thermal, but not mechanical hyperalgesia in rats with primary sensory neuron injury. *Pain*, 114(1–2), 266–77. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.12.027>
- Webb, M. E., Marquet, A., Mendel, R. R., Rébeillé, F., & Smith, A. G. (2007). Elucidating biosynthetic pathways for vitamins and cofactors. *Natural Product Reports*, 24(5), 988–1008. <https://doi.org/10.1039/b703105j>

- Weber, W., & Kewitz, H. (1985). Determination of thiamine in human plasma and its pharmacokinetics. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 28(2), 213–9.
- Wilhelm, C. J., & Guizzetti, M. (2015). Fetal Alcohol Spectrum Disorders: An Overview from the Glia Perspective. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 9, 65. <https://doi.org/10.3389/fnint.2015.00065>
- Wilkinson, T. J., & Hanger, H. C. (n.d.). Clinical relevance of thiamine status amongst hospitalized elderly patients. *Gerontology*, 46(5), 293. <https://doi.org/10.1159/000022173>
- Xu, K., Zhang, M., Zhao, Q., Yu, F., Guo, H., Wang, C., ... Zhang, P. (2013). Crystal structure of a folate energy-coupling factor transporter from *Lactobacillus brevis*. *Nature*, 497(7448), 268–71. <https://doi.org/10.1038/nature12046>
- Yamashita, H., Zhang, Y. X., & Nakamura, S. (1993). The effects of thiamin and its phosphate esters on dopamine release in the rat striatum. *Neuroscience Letters*, 158(2), 229–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8233101>
- Yang, G., Meng, Y., Li, W., Yong, Y., Fan, Z., Ding, H., ... Ke, Z.-J. (2011). Neuronal MCP-1 mediates microglia recruitment and neurodegeneration induced by the mild impairment of oxidative metabolism. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 21(3), 279–97. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2010.00445.x>
- Yu, Q., Liu, H., Sang, S., Chen, L., Zhao, Y., Wang, Y., & Zhong, C. (2018). Thiamine deficiency contributes to synapse and neural circuit defects. *Biological Research*, 51(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0184-5>
- Yuan, A., Rao, M. V, Veeranna, & Nixon, R. A. (2017). Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018309>
- Zahr, N. M., Sullivan, E. V, Rohlfing, T., Mayer, D., Collins, A. M., Luong, R., & Pfefferbaum, A. (2016). Concomitants of alcoholism: differential effects of thiamine deficiency, liver damage, and food deprivation on the rat brain in vivo. *Psychopharmacology*, 233(14), 2675–86. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4313-y>
- Zapadnyuk IP, Zapadnyuk VI, Z. E. (1983). *Laboratory Animals. Breeding, Management, Use in Experiment*. Kyiv: Vyshcha Shkola.
- Zeng, W.-Q., Al-Yamani, E., Acierno, J. S., Slaugenhaupt, S., Gillis, T., MacDonald, M. E., ... Gusella, J. F. (2005). Biotin-responsive basal ganglia disease maps to 2q36.3 and is due to mutations in SLC19A3. *American Journal of Human Genetics*, 77(1), 16–26. <https://doi.org/10.1086/431216>

- Zhang, Q., Yang, G., Li, W., Fan, Z., Sun, A., Luo, J., & Ke, Z.-J. (2011). Thiamine deficiency increases β -secretase activity and accumulation of β -amyloid peptides. *Neurobiology of Aging*, 32(1), 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.01.005>
- Zhao, R., Gao, F., & Goldman, I. D. (2002). Reduced folate carrier transports thiamine monophosphate: an alternative route for thiamine delivery into mammalian cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 282(6), C1512-7. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00547.2001>
- Zhao, R., Gao, F., Wang, Y., Diaz, G. A., Gelb, B. D., & Goldman, I. D. (2001). Impact of the reduced folate carrier on the accumulation of active thiamin metabolites in murine leukemia cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(2), 1114–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007919200>
- Zhao, R., & Goldman, I. D. (2013). The proton-coupled folate transporter: physiological and pharmacological roles. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(6), 875–80.
- Zita Weise Prinzo. (1999). *Thiamine deficiency*. World Health Organization.
- Воскобоев, А. И. (1987). *Биосинтез, деградация и транспорт фосфорных эфиров тиаминa*. Минск: Наука и техника.
- Островский Ю. М. (1975). *Активные центры и группировки в молекуле тиаминa* (Наука и Те). Минск.
- Островский Ю. М. (1979). *Экспериментальная витаминология* (Наука и Те). Минск.