

Синергидные нейропротекторные эффекты тиамина, пиридоксина и цианокобаламина в рамках протеома человека

Громова О.А.^{1,2}, Торшин И.Ю.^{1,2}, Гусев Е.И.²

¹ – ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия», г. Иваново

² – РСЦ Института Микроэлементов ЮНЕСКО при ФГБОУ ВПО РНИМУ им Н.И. Пирогова, г. Москва

Резюме. Витамины группы В характеризуются нейропротекторными эффектами. Механизмы синергидного действия различных комбинаций витаминов недостаточно изучены. В настоящем исследовании в геномных и протеомных базах данных были найдены белки, активность или уровни которых взаимосвязаны с обеспеченностью организма витаминами В₁ (тиамин), В₆ (пиридоксин) и В₁₂ (цианокобаламин). Системно-биологический анализ показал, что тиамин необходим для синтеза АТФ (в т. ч. посредством метаболизма глюкозы, липидов и аминокислот с разветвленной цепью), кроветворения и для роста и поддержания структуры нейронов. Пиридоксин-зависимые белки протеома необходимы для метаболизма аминокислот, синтеза АТФ, синтеза нейротрансмиттеров и мембран нейронов. Витамин В₁₂ необходим для метаболизма липидов, кроветворения и проявляет нейропротекторный и нейротрофический эффекты. Выявлены многочисленные синергидные взаимодействия витаминов В₁, В₆, В₁₂ на молекулярном уровне, включающие метаболизм аминокислот, углеводов, липидов, формирование структур нейронов, кроветворение, синтез АТФ и др. Установленные механизмы синергизма витаминов В₁, В₆, В₁₂ на молекулярном уровне имеют фундаментальное значение для нейропротекции и профилактики цереброваскулярной патологии.

Ключевые слова: тиамин, пиридоксин, цианокобаламин, синергизм, биоинформатика, нейропротекция, Нейробион

Synergistic neuroprotective effects of thiamine, pyridoxine and cyanocobalamin on the level of human proteome

Gromov O.A.^{1,2}, Torshin I.Yu.^{1,2}, Gusev E.I.²

¹ – «Ivanovo State Medical Academy», Ivanovo

² – RIC Institute of trace elements at UNESCO VPO Rnrmu them NI Pirogov, Moscow

Resume. Group B vitamins are characterized by neuroprotective effects. Mechanisms of action of synergistic combinations of various vitamins are insufficiently studied. In this study, proteins with activity or levels dependent on vitamins В₁ (thiamine), В₆ (pyridoxine) and В₁₂ (cyanocobalamin) were found in genomic and proteomic databases. Systems biology analysis showed that the thiamine is necessary for synthesis of ATP (glucose metabolism, lipid and branched chain amino acids), hemopoiesis and maintenance of neuronal structure. Pyridoxine-dependent proteins of the proteome are necessary for the metabolism of amino acids, ATP synthesis, synthesis of neurotransmitters and of neuronal membranes. Vitamin В₁₂ is needed for the metabolism of lipids, hemopoiesis and shows neuroprotective and neurotrophic effects. We identified numerous synergistic interactions of vitamins В₁, В₆, В₁₂, at the molecular level, including the metabolism of amino acids, carbohydrates, lipids, forming structures of neurons, blood, ATP synthesis etc. The established mechanisms of vitamins В₁, В₆, В₁₂ synergy at the molecular level are of fundamental importance for neuroprotection and prevention of cerebrovascular disease.

Keywords: thiamine, pyridoxine, cyanocobalamin, synergy, bioinformatics, neuroprotection, Neurobion

Автор, ответственный за переписку:

Громова Ольга Алексеевна – д.м.н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА МЗ России; 153012, г. Иваново, Шереметевский пр., 8; тел. +7 (4932) 41-65-25; e-mail: unesco.gromova@gmail.com

Введение

Витамины группы В реализуют свои нейрофизиологические роли за счёт поддержания активности определённых ферментов и других разновидностей белков, входящих в протеом человека. Активность белков протеома зависит от множества кофакторов и, в частности, от витаминов В₁, В₆ и В₁₂. Например, синтез АТФ осуществляется посредством ферментов, кофакторами которых являются тиамин фосфат и пиридоксаль фосфат [1]. Кроме того, молекулярно-биологические роли витамина В₆ (производное пиридоксина) включают метаболизм аминокислот, синтез нейротрансмиттеров, биосинтез других вита-

минов. Витамин В₁₂ необходим для поддержания метаболизма фолатов, обезвреживания гомоцистеина и др.

Дефициты эти витаминов приводят к развитию неврологических заболеваний. Например, глубокий дефицит витамина В₁ у пациентов с алкоголизмом приводит к развитию синдрома С.С. Корсакова, характеризующегося снижением памяти на ближайшие события, депрессией, плаксивостью и демиелинизацией [2].

Для оценки реального масштаба воздействия витаминов В₁, В₆ и В₁₂ на организм человека следует рассмотреть их эффекты в постгеномной перспективе (рис. 1), т. е. в рамках воздействия на геном (совокупность всех генов организма), транскриптом (совокуп-



Рис. 1. Биологические эффекты витаминов группы В в постгеномной перспективе

ность всех РНК), протеом (совокупность всех белков) и метаболом (совокупность всех метаболитов) [3].

Важно отметить, что за широкий круг биологических ролей витаминов В₁, В₆, В₁₂ отвечают специфические взаимодействия производных этих витаминов именно с белками *протеома*. Пиридоксин, тиамин, цианокобаламин не взаимодействуют ни с геномной ДНК, ни с РНК транскриптома, а продукты биотрансформаций молекул про-витаминов и активных форм витаминов просто являются отдельными метаболитами из метаболома. В то же время, проведённые нами поиски по базам данных протеома человека (NCBI PROTEIN, EMBL, UNIPROT, Human Proteome Map (HPM), BIOCYS-HUMAN и др.) показали, что в протеоме человека существуют 78 витамин-В₆-зависимых белков, 22 витамин-В₁-зависимых белков, и 24 витамин-В₁₂-зависимых белков (см. рис. 1). Системно-биологический анализ этих массивов белков позволяет провести комплексную системно-биологическую оценку всех возможных биологических эффектов сочетания витаминов В₁, В₆, В₁₂, и, соответственно, оценить спектр клинических применений синергидного сочетания этих витаминов.

Материалы и методы

Списки из 22 витамин-В₁-зависимых белков, 78 витамин-В₆-зависимых белков, и 24 витамин-В₁₂-зависимых белков (включая белки метаболизма и транспорта перечисленных витаминов), составленные на основе имеющихся аннотаций генома человека в базах данных NCBI PROTEIN, EMBL, UNIPROT и HPM, анализировались посредством метода функционального связывания [3]. Анализ функциональных взаимосвязей — одна из информационных технологий современной

биоинформатики. Данный метод основан на системном рассмотрении органов, тканей, клеток и их мельчайших компонентов — белков, ДНК, метаболитов (в т. ч. витаминов и других микронутриентов), в рамках фундаментальных основ молекулярной биологии и биохимии. Так, на основе информации определённой геномной ДНК синтезируется соответствующий белок, выполняющий строго очерченный круг специфических функций. Как врождённые мутации гена, так и дефициты кофакторов белка (витаминов В₁, В₆, В₁₂ других витаминов и минералов) будут приводить к падению активности тех или иных белков и проявлению той или иной специфической неврологической симптоматики (рис. 2).

Метод анализа функциональных взаимосвязей, соединяя данные различных уровней информации (данные о моногенных заболеваниях, биохимические данные о кофакторах белков, данные о клеточных ролях белков, симптоматику и критерии диагностики заболеваний и т. д.) в различных базах данных (БД), позволяет систематически рассмотреть все возможные биологические роли витаминов В₁, В₆, В₁₂ и их синергидных сочетаний. В целом, при использовании метода анализа функциональных взаимосвязей (см. рис. 2) каждый белок протеома человека представлен строкой в списке, включающем такие описания белка/гена как:

- аминокислотная последовательность белка;
- список эссенциальных кофакторов белка (в т. ч. с указанием потребности в производных витаминов В₁, В₆, В₁₂ для активности рассматриваемого белка);
- список моногенных заболеваний, связанных с полной или частичной потерей активности этого белка и соответствующего гена;
- список клинических симптомов рассматриваемых моногенных заболеваний;



Рис. 2. Основы системно-биологического подхода к анализу витамин-В-зависимых белков

- список клеточных функций белка (по БД Gene Ontology, GO и др.);
- список отдельных симптомов заболеваний, список диагнозов по МКБ-10 и другая информация из баз данных.

Далее, в полученном списке выделяются гены, соответствующие белкам из списка витамин-В₁-зависимых белков и др. и проводятся последующие анализы биологических ролей этих белков на основании статистических критериев. Для статистической обработки результатов исследования использовались методы математической статистики, включающие расчёт числовых характеристик случайных величин, проверки статистических гипотез с использованием параметрических и непараметрических критериев, корреляционного и дисперсионного анализа. Сравнение прогнозируемых и наблюдаемых частот встречаемости исследуемых признаков проводилось с помощью критерия χ -квадрат, критерия Вилкоксона–Манна–Уитни и теста Стьюдента. Для статистической обработки материала использовалась прикладная программа STATISTICA 6.0 и электронные таблицы Microsoft Excel.

Результаты

В результате проведённого анализа, среди известных 50 057 белков протеома человека было выделено 20 180 аннотированных белков протеома (т. е. белков, для которых известны хотя бы основные биологические роли). Среди 20 180 белков, 78 являлись витамин-В₆-зависимыми, 22 – витамин-В₁-зависимыми, и 24 – витамин-В₁₂-зависимыми белками. Рассмотрение всего массива этих белков в рамках настоящей статьи не представляется возможным. Поэтому, рассмотрим различные способы системно-биологической группировки этих белков в соответствии с различными международными рубриками биологических ролей белков и системой классификации заболеваний МКБ-10.

Анализ нейробиологических и клинических эффектов витамин-В₁-зависимых белков

Анализ витамин-В₁-зависимых белков, аннотированных в соответствии с международной номенклатурой Gene Ontology (GO) позволил установить нейробиологические роли белков, ассоциированных с эффектами тиамина (табл. 1).

Таблица 1

Биологические роли тиамин-зависимых белков

Биологическая роль	n_1	v_1	v_0	$P(\chi^2)$
Митохондриальный белок	9	0,409	0,137	0,006922
Цикл Кребса	6	0,273	0,005	4,58E-18
Пируватдегидрогеназа	3	0,136	0,000	2,27E-12
Оксоглутарат дегидрогеназа	3	0,136	0,000	2,27E-12
Катаболизм аминокислот с разветвленной цепью	3	0,136	0,007	1,02E-05
Гликолиз	3	0,136	0,000	2,27E-12
Метаболизм глюкозы	3	0,136	0,007	1,02E-05
Митохондриальная α -кетоглутарат дегидрогеназа	3	0,136	0,000	2,27E-12
Транскетолаза	3	0,136	0,000	2,27E-12
Связывание иона магния	3	0,136	0,019	0,008306
Миелиновая оболочка	2	0,091	0,012	0,040298
Пероксисомальный белок	2	0,091	0,019	—
Активация сигнального пути рецептора аденозина	1	0,045	0,000	0,000274
Метаболизм аденозина	1	0,045	0,007	—
Развитие пирамидальных нейронов	1	0,045	0,002	0,036033
Развитие таламуса	1	0,045	0,000	0,000274
Развитие гиппокампа	1	0,045	0,005	—
Развитие стриатума	1	0,045	0,000	0,000274
Развитие коры мозжечка	1	0,045	0,000	0,000274
Транспортер фолатов	1	0,045	0,000	0,000274
Дифференцировка клеток при гемопоэзе	1	0,045	0,005	—
Альфа-окисление жирных кислот	1	0,045	0,000	0,000274

Примечание: биологические роли приведены в соответствии с номенклатурой Gene Ontology (GO). n_1 — число V_1 -зависимых белков с данной биологической ролью; v_1 — частота встречаемости биологической роли в выборке V_1 -зависимых белков; v_0 — общая частота встречаемости биологической роли во всём протеоме; О.Ш. — отношение шансов (v_1/v_0); $P(\chi^2)$ — достоверность ассоциации. Биологические роли в таблице упорядочены в соответствии со значением числа V_1 -зависимых белков (n_1).

Анализ перечисленных в табл. 1 биологических ролей V_1 -зависимых белков позволил выделить 4 основных направления воздействия тиамина на организм:

- **Неврологические роли** (миелиновая оболочка, активация сигнального пути рецептора аденозина, метаболизм аденозина, развитие пирамидальных нейронов, развитие таламуса, развитие гиппокампа, развитие стриатума, развитие коры мозжечка);

- **Энергетический метаболизм клетки и синтез АТФ** (митохондрия, митохондриальная α -кетоглутарат дегидрогеназа, цикл Кребса, пируватдегидрогеназа, оксоглутарат дегидрогеназа, связывание иона магния);

- **Метаболизм углеводов** (гликолиз, метаболизм глюкозы, транскетолаза), **жиров** (α -окисление жирных кислот), аминокислот (катаболизм аминокислот с разветвленной цепью);

- **Кроветворение** (транспортер фолатов, дифференцировка клеток при гемопоэзе).

Далее рассмотрим, как витамин V_1 влияет на более «крупные» фрагменты метаболизма — внутриклеточные сигнальные каскады, биосинтетические каскады и другие элементы реактома человека (как известно, реактом — совокупность всех химических реакций, протекающих в нейронах, других клетках и в межклеточном пространстве с участием элементов протеома и метаболома).

Данный анализ был проведён с использованием аннотаций белков протеома человека, приведённых

в базе данных REACTOME (рис. 3). Результаты анализа подтверждают приведённую выше рубрику биологической ролей тиамина и указывают на дополнительные механизмы действия тиамина (передача сигналов ретиноидов). Заметим, что потеря памяти при синдроме С.С.Корсакова ассоциирована с авитаминозом V_1 и, в частности, с нарушениями метаболизма аминокислот с разветвлённой цепью. Как известно, для восстановления памяти назначаются фармакологические дозы витамина V_1 (50–100 мг/сут).

Описанный выше весьма обширный спектр нейробиологических ролей V_1 -зависимых белков обуславливает не менее широкий спектр заболеваний. Анализ данных симптомов с учётом данных, представленных в базах данных OMIM, ORPHA, ICD-10, позволил выделить диагнозы по МКБ-10, специфически ассоциированные с V_1 -зависимыми белками (рис. 4). Заметим, что практически все перечисленные заболевания, ассоциированные с недостаточностью витамина V_1 , имеют неврологическую симптоматику. Например, любая форма анемии, особенно тиамин-зависимая мегалобластная анемия, ассоциирована с головокружением, апатией, астенией, снижением памяти и пр. вследствие хронической гипоксии мозга.

Дефицит V_1 во время беременности ассоциирован с аномалиями развития (в т. ч. микроцефалией, дистрофией мышц, энцефалопатией). Низкая обеспеченность витамином V_1 ассоциирована с такими заболеваниями,



Рис. 3. Аннотации V_1 -зависимых белков протеома человека в базе данных REACTOME. Приведены числа соответствующих белков

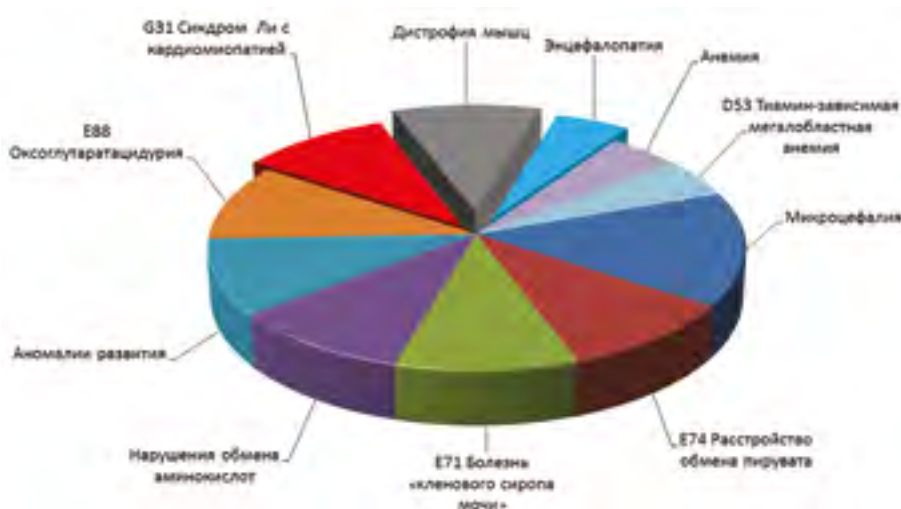


Рис. 4. Заболевания, специфически ассоциированные с V_1 -зависимыми белками протеома человека

как E74, расстройство обмена пирувата, E71 Болезнь «кленового сиропа мочи», E88 Оксоглутаратацидурия, G31 Синдром Ли с кардиомиопатией, также характеризующихся тяжёлой неврологической симптоматикой.

Подчеркнём, что перечисленные симптомы и заболевания ассоциированы с нуклеотидными дефектами генов, кодирующих обсуждаемые V_1 -зависимые белки протеома (см. Методы). Однако, поскольку биологическая активность этих белков в существенной мере зависит от обеспеченности организма витамином V_1 , то дефицит этого витамина будет приводить к симптоматике, схожей с описанными проявлениями генетических дефектов. Заметим, что течение этих врождённых заболеваний значительно утяжеляется на фоне дефицита витамина V_1 , а для компенсации потребности в витамине V_1 у таких пациентов используются более высокие дозы [2].

Анализ нейробиологических и клинических эффектов витамин- V_6 -зависимых белков

Анализ биологических ролей V_6 -зависимых белков, аннотированных в соответствии с международной номенклатурой Gene Ontology (GO) позволил установить нейробиологические роли белков, ассоциированные с эффектами пиридоксаль-5-фосфата — основной биологически активной формы витамина V_6 (табл. 2).

Анализ перечисленных в табл. 2 биологических ролей V_6 -зависимых белков показал, что витамин V_6 , связывающийся с белками в виде кофактора пиридоксаль-5-фосфата, оказывает следующие воздействия витамина V_6 на организм:

- **Неврологические роли** (биосинтез сфинголипидов, биосинтез ГАМК, миелин);
- **Метаболизм аминокислот** (L-цистеина, L-фенилаланина, L-аланина, L-аспартата, L-серина,

Таблица 2

Биологические роли V_6 -зависимых белков. Биологические роли приведены в соответствии с номенклатурой базы данных (БД) Gene Ontology (GO)

БД «GO»	Биологическая роль	n_1	v_1	v_0	О.Ш.
GO:0030170	Связывание пиридоксальфосфата	54	0,692	0,000	8,6-10-36
GO:0005829	Цитозоль	33	0,423	0,182	0,00068
GO:0005759	Митохондриальный матрикс	18	0,231	0,047	0,00011
GO:0008652	Биосинтез аминокислот	8	0,103	0,005	0,00098
GO:0006103	Метаболизм 2-оксоглутарата	6	0,077	0,005	0,010
GO:0006532	Биосинтез аспартата	5	0,064	0,000	0,006
GO:0030148	Биосинтез сфинголипидов	4	0,051	0,000	0,019
GO:0008483	Активность трансаминазы	4	0,051	0,000	0,019
GO:0006563	Метаболизм L-серина	4	0,051	0,000	0,019
GO:0006536	Метаболизм L-глутамата	4	0,051	0,000	0,019
GO:0001666	Ответ на гипоксию	4	0,051	0,000	0,019
GO:0009449	Биосинтез ГАМК	5	0,064	0,005	0,031
GO:0080130	L-фенилаланин: 2-оксоглутарат аминотрансфераза	3	0,038	0,000	0,058
GO:0070189	Метаболизм кинуренина	3	0,038	0,000	0,058
GO:0046487	Метаболизм глиоксилата	3	0,038	0,000	0,058
GO:0043546	Молибдоптерин	3	0,038	0,000	0,058
GO:0043209	Миелин	3	0,038	0,000	0,058
GO:0042866	Биосинтез пирувата	3	0,038	0,000	0,058
GO:0042853	Катаболизм L-аланина	3	0,038	0,000	0,058
GO:0042816	Метаболизм витамина V_6	3	0,038	0,000	0,058
GO:0035999	Метаболизм тетрагидрофолата	3	0,038	0,000	0,058
GO:0019343	Биосинтез цистеина (метаболизм гомоцистеина)	3	0,038	0,000	0,058
GO:0006783	Биосинтез гема	3	0,038	0,000	0,058
GO:0006569	Катаболизм L-триптофана	3	0,038	0,000	0,058
GO:0006565	Катаболизм L-серина	3	0,038	0,000	0,058
GO:0006554	Катаболизм L-лизина	3	0,038	0,000	0,058
GO:0006094	Глюконеогенез	3	0,038	0,000	0,058
GO:0005980	Катаболизм гликогена	3	0,038	0,000	0,058
GO:0001887	Метаболизм селена	3	0,038	0,000	0,058
GO:0050661	Связывание кофактора НАДФ	3	0,038	0,000	0,058
GO:0000287	Связывание иона магния	3	0,038	0,000	0,058

Примечание: n_1 — число V_6 -зависимых белков с данной биологической ролью; v_1 — частота встречаемости биологической роли в выборке V_6 -зависимых белков; v_0 — общая частота встречаемости биологической роли во всём протеоме; О.Ш. — отношение шансов (v_1/v_0); $P(\chi^2)$ — достоверность ассоциации. Биологические роли в таблице упорядочены в соответствии со значением числа V_6 -зависимых белков (n_1).

L-глутамата, L-триптофана, L-лизина, активность трансаминазы);

• **Энергетический метаболизм клетки и синтез АТФ** (ответ на гипоксию, митохондриальный матрикс, метаболизм 2-оксоглутарата, метаболизм глиоксилата, биосинтез пирувата, глюконеогенез, катаболизм гликогена);

• **Синергидные пиридоксину микронутриенты** (магний, тетрагидрофолат, гем, селен, НАДФ, молибдоптерин).

Эти биологические роли витамин- V_6 -зависимых белков обуславливают определённый спектр врождённых заболеваний, специфически ассоциированных с нарушениями активации V_6 -зависимых белков протео-

ма человека. Анализ таких заболеваний на основе данных, представленных в базах данных OMIM, ORPHA, ICD-10, позволил выделить диагнозы по МКБ-10, специфически ассоциированные с V_6 -зависимыми белками протеома человека. Так, дефицит активности пиридоксин-зависимых белков был достоверно ассоциирован с нарушениями метаболизма аминокислот (E72 Другие нарушения обмена аминокислот; E70 Нарушения обмена ароматических аминокислот; G40 Эпилепсия), нарушениями кроветворения (D58 Другие наследственные гемолитические анемии, D72 Другие нарушения белых кровяных клеток) и др. (табл. 3, рис. 5).

Таблица 3

Генетически-обусловленные заболевания в номенклатуре МКБ-10 и соответствующие симптомы, специфически ассоциированные с V_6 -зависимыми белками

Заболевание/симптоматика	n_1	v_1	v_0	О.Ш.	$P(\chi^2)$
Нарушение обмена веществ	20	0,055	0,0029	19,16	$6,8 \cdot 10^{-70}$
Аминокислота	17	0,046	0,0027	17,02	$2,3 \cdot 10^{-52}$
E72 Другие нарушения обмена аминокислот	12	0,033	0,0012	27,47	$2,3 \cdot 10^{-60}$
Малокровие	8	0,022	0,0013	16,84	$2,7 \cdot 10^{-24}$
G40 Эпилепсия	6	0,016	0,0006	27,91	$1,3 \cdot 10^{-30}$
E70 Нарушения обмена ароматических аминокислот	6	0,016	0,0008	20,60	$1,6 \cdot 10^{-22}$
Нейротрансмиссия	4	0,011	0,0001	88,74	$3,0 \cdot 10^{-57}$
D58 Другие наследственные гемолитические анемии	4	0,011	0,0006	19,23	$5,4 \cdot 10^{-14}$
Гипероксалурия	3	0,008	0,0000	173,05	$3,2 \cdot 10^{-69}$
D72 Другие нарушения белых кровяных клеток	2	0,005	0,0000	288,41	$8,6 \cdot 10^{-62}$
D89 Другие нарушения иммунитета	2	0,005	0,0002	26,22	$1,1 \cdot 10^{-09}$

Примечание: n_1 — число V_6 -зависимых белков, соответствующих заболеванию/симптому; v_1 — частота встречаемости заболевания/симптома в выборке V_6 -зависимых белков; v_0 — общая частота встречаемости в протеоме; О.Ш. — отношение шансов (v_1/v_0); $P(\chi^2)$ — достоверность ассоциации. Заболевания/симптомы в таблице упорядочены в соответствии со значениями n_1 .



Рис. 5. Заболевания в номенклатуре МКБ-10, специфически ассоциированные с V_6 -зависимыми белками протеома человека. Приведены числа соответствующих белков

Анализ нейробиологических и клинических эффектов витамин- V_{12} -зависимых белков

Анализ биологических ролей 24 витамин- V_{12} -зависимых белков, аннотированных в соответствии с международной номенклатурой Gene Ontology (GO) позволил установить биологические роли белков, ассоциированные с эффектами витамина V_{12} (табл. 4). При этом важно отметить, что цианкобаламин является кофактором всего двух ферментов — метилмалонил-КоА мутазы митохондрий (участвует в деградации аминокислот, жирных кислот, холестерина в цикле Кребса) [4] и метионин синтетазы (обезвреживает гомоцистеин). Остальные белки либо вовлечены в

транспорт, биотрансформации и выведение производных витамина V_{12} , либо витамин V_{12} непосредственно влияет на экспрессию этих белков.

Анализ перечисленных в таблице биологических ролей V_{12} -зависимых белков показал, что витамин V_{12} оказывает следующие воздействия на организм:

- **Метаболизм жиров** (метаболизм липопротеинов, метаболизм холестерина, катаболизм жирных кислот с короткой цепью, пищеварение). Нарушение активности соответствующих белков клинически выражается формированием про-атеросклеротического липидного профиля.

Биологические роли V_{12} -зависимых белков. Биологические роли приведены в соответствии с номенклатурой Gene Ontology (GO)

Биологическая роль	n_1	v_1	v_0	$P(\chi^2)$
Метаболизм кобаламина	20	0,833	0,000	1,3E-50
Межклеточное пространство	8	0,333	0,065	0,000181
Пищеварение	4	0,167	0,000	1,31E-09
Связывание ФАД	2	0,083	0,004	0,003859
Метаболизм липопротеинов	2	0,083	0,004	0,003859
Метилирование ДНК	2	0,083	0,000	6,56E-05
Катаболизм жирных кислот с короткой цепью	2	0,083	0,000	6,56E-05
Клеточный ответ на оксид азота NO	1	0,042	0,000	0,011972
Переработка гомоцистеина	1	0,042	0,000	0,011972
Метаболизм фолатов	1	0,042	0,000	0,011972
Метаболизм витамина D	1	0,042	0,000	0,011972
Регенерация аксонов	1	0,042	0,000	0,011972
Метаболизм холестерина	1	0,042	0,008	—
Процесс биосинтеза гема	1	0,042	0,000	0,011972
Метаболизм глутатиона	1	0,042	0,000	0,011972
Метилмалонил-КоА мутаза	1	0,042	0,000	0,011972
Дифференцировка гемопоэтических клеток-предшественников	1	0,042	0,008	—

Примечание: n_1 — число V_{12} -зависимых белков с данной биологической ролью; v_1 — частота встречаемости биологической роли в выборке V_{12} -зависимых белков; v_0 — общая частота встречаемости биологической роли во всём протеоме; О.Ш. — отношение шансов (v_1/v_0); $P(\chi^2)$ — достоверность ассоциации. Биологические роли в таблице упорядочены в соответствии со значением числа V_{12} -зависимых белков (n_1).

• **Кроветворение** (дифференцировка гемопоэтических клеток-предшественников, метилирование ДНК, переработка гомоцистеина, метаболизм кобаламина, метаболизм фолатов). Нарушение активности соответствующих белков соответствует формированию V_{12} -зависимой анемии.

• **Нейропротекторный и нейротрофический эффекты** (ответ на повреждение аксонов, регенерация аксонов, клеточный ответ на оксид азота NO, метаболизм глутатиона). При дефиците витамина V_{12} активность соответствующих белков нарушается, что снижает выживаемость нейронов и способствует ишемизации нервной ткани.

• **Метаболизм микронутриентов** (метаболизм кобаламина, метаболизм фолатов, метаболизм витамина D, биосинтез гема). Нарушение активности соответствующих белков будет приводить к снижению биологической активности не только витамин- V_{12} -зависимых белков, но и нарушениям экспрессии многочисленных фолат-зависимых витамин-D-зависимых генов.

Анализ реактомных ролей V_{12} -зависимых белков подтвердил сделанные выше выводы и, также, указал на возможный антибактериальный эффект витамина V_{12} (синтез антимикробного пептида альфа-дефенсина, рис. 6).

Дефицит активности витамин- V_{12} -зависимых белков, особенно во внутриутробном периоде, приводит к весьма драматическим последствиям. С нарушениями

активации V_{12} -зависимых белков протеома человека ассоциирован целый спектр врождённых заболеваний. Так, дефицит активности V_{12} -зависимых белков связан, в частности, с аномалиями развития (F78 Другие нарушения развития интеллекта, Q21 Врождённые аномалии перегородок сердца, G60 Наследственная и идиопатическая невропатия) и такими патологиями, как E72 Другие нарушения аминокислотного обмена, E71 Болезнь «кленового сиропа мочи», метаболическими нарушениями (ацидемия, ацидурия, гомоцистинурия, избыток метилмалоновой кислоты), I42 Кардиомиопатия, K86 Другие болезни поджелудочной железы, E80 Нарушения порфиринового и билирубинового метаболизма, D51 Витамин V_{12} -дефицитная анемия (рис. 7).

Анализ молекулярных механизмов синергидного действия витаминов V_1 , V_6 , V_{12}

В неврологии традиционно используются витамины группы B, особенно в комбинации «витамины V_1 , V_6 и V_{12} ». Такая комбинация возникла не случайно, а основана на долговременной клинической практике лечения полинейропатии. Проведённый в настоящей работе анализ синергидных биологических ролей V_1 , V_6 , V_{12} -зависимых белков в номенклатуре Gene Ontology (GO) показал, что «тройственный синергизм» $V_1 + V_6 + V_{12}$ необходим, прежде всего, для поддержания функции различных компартментов клетки (митохондрий, клеточных мембран, пероксисом, ядра



Рис. 6. Аннотации B₁₂-зависимых белков протеома человека в базе данных REACTOME. Приведены числа соответствующих белков



Рис. 7. Заболевания, ассоциированные с дефицитом активности B₁₂-зависимых белков. Приведены числа соответствующих белков

клетки) и синтеза АТФ. Парный синергизм B₁ + B₆ необходим для катаболизма аминокислот, глюкозы, жирных кислот, синтеза белка на рибосоме и синтеза миелиновой оболочки нейронов (табл. 5).

Реактомный анализ показал, что синергидное сочетание витаминов B₁ и B₆ необходимо для метаболизма аминокислот и углеводов, а синергидное сочетание B₆ + B₁₂ — для биосинтеза гема и метаболизма липидов (табл. 6).

Анализ заболеваний, ассоциированных с дефицитами активности B₁, B₆, B₁₂-зависимых белков

показал, что «тройственный синергизм» необходим для профилактики анемии (в т. ч. мегалобластной), врождённых аномалий развития, нарушений метаболизма аминокислот, нарушений обмена фолатов и гомоцистеина (табл. 7). Синергидное сочетание «B₁ + B₁₂» профилактует расстройства метаболизма аминокислот с разветвлённой цепью и липидов (диагнозы группы E71); синергидное сочетание «B₁ + B₆» важно для профилактики дистрофии мышц, энцефалопатии, E74 Других нарушений углеводного обмена. Синергидное сочетание «B₆ + B₁₂» важно для

Таблица 5

Синергидные биологические роли V_1 , V_6 , V_{12} -зависимых белков

GO номер	GO-функция	n_1	n_6	n_{12}
GO:0005759	Митохондриальный матрикс	9	18	3
GO:0005739	Митохондрия	9	32	5
GO:0016021	Компонент клеточной мембраны	6	8	5
GO:0005829	Цитозоль	3	33	6
GO:0000287	Связывание иона магния	3	4	1
GO:0005777	Пероксисома	2	3	1
GO:0005654	Ядро клетки	2	10	1
GO:0005524	Связывание АТФ	1	5	2
GO:0002244	Гемопоз	1	0	1
GO:0009083	Катаболизм аминокислот с разветвленной цепью	3	2	0
GO:0006006	Метаболизм глюкозы	3	1	0
GO:0043209	Миелиновая оболочка	2	3	0
GO:0006554	Катаболизм лизина	1	3	0
GO:0006103	Метаболизм 2-оксоглутарата	1	6	0
GO:0006098	Пентозофосфатный шунт	1	1	0
GO:0003735	Структурный компонент рибосомы	1	4	0
GO:0001561	Альфа-окисление жирных кислот	1	1	0

Примечание: биологические роли приведены в соответствии с номенклатурой Gene Ontology (GO). n_1 , n_6 , n_{12} — числа V_1 -, V_6 , V_{12} -зависимых белков, соответственно.

Таблица 6

Синергидные реактомные роли V_1 , V_6 , V_{12} -зависимых белков

REACTOME	Реактомная функция	n_1	n_6	n_{12}
HSA-71336	Пентозофосфатный шунт	1	1	0
HSA-189451	Биосинтез гема	0	2	1
HSA-194223	Транспорт ЛПВП липидов	0	1	2
HSA-71064	Катаболизм лизина	1	3	0
HSA-389661	Метаболизм глиоксилата и деградация глицина	7	2	0
HSA-70895	Катаболизм аминокислот с разветвлённой цепью	3	2	0

Примечание: биологические роли приведены в соответствии с номенклатурой базы данных REACTOME (GO). n_1 , n_6 , n_{12} — числа V_1 -, V_6 , V_{12} -зависимых белков, соответственно.

профилактики наследственной и идиопатической невропатии (G60), нарушений метаболизма порфирина и билирубина (E80) и нарушений эритропоэза, приводящих к анемии.

Наиболее известным и крайне важным направлением тройственного синергидного действия витаминов V_1 , V_6 , V_{12} является регуляция процессов воспаления, осуществляемая, в частности, посредством **обезвреживания гомоцистеина**. Обычно, повышенные уровни гомоцистеина связывают только с недостатком активных фолатов в пище. Однако повышенный гомоцистеин является и результатом дефицита других витаминов группы В (прежде всего, V_6 и V_{12}) [5]. В крупномасштабном исследовании 10 601 здоровых добровольцев (средний возраст 56 лет) были проанализированы эффекты всех известных витаминов V_6 , фолатов, кобаламина, рибофлавина на уровни общего гомоцистеина. Было установлено, что более высоким

концентрациям пиридоксаль-5-фосфата крови соответствовали более низкие уровни гомоцистеина [6].

Весьма интересным результатом проведённого анализа является установление молекулярных механизмов тройственного синергидного действия витаминов V_1 , V_6 , V_{12} на **поддержание миелиновой оболочки нейронов** (код GO:0043209 по номенклатуре GO). Так, миелиновая и митохондриальные фракции нервов содержат значительные количества тиамина [7]. Активность тиамин-зависимых ферментов важна для поддержания нейронального синтеза АТФ и синтеза миелиновых оболочек [8].

В частности, **тиамин** необходим для поддержания активности таких целевых V_1 -зависимых ферментов как *пируват дегидрогеназы митохондрий* (субъединица E1, ген PDHA1) и транскетолазы (ген ТКТ). У пациентов с митохондриальной энцефаломиелопатией отмечено снижение активности *пируват дегидроге-*

Генетически-обусловленные заболевания в номенклатуре МКБ-10 и соответствующие синдромы, ассоциированные с сочетанными дефицитами В₁, В₆, В₁₂-зависимых белков

Синдром/заболевание	n ₁	n ₆	n ₁₂
Анемия	3	8	2
Аномалии развития	2	9	2
Нарушения метаболизма аминокислот	2	9	14
Нарушения обмена фолатов	1	3	1
E71 Болезнь «кленового сиропа мочи»	2	0	2
E71 Расстройства метаболизма аминокислот с разветвленной цепью и липидов	2	0	6
Дистрофия мышц	2	2	0
E74 Другие нарушения углеводного обмена	4	2	0
Энцефалопатия	4	2	0
E72 Другие нарушения аминокислотного обмена	0	12	10
E80 Болезни нарушения порфирина и билирубина	0	2	2
Эритропоэз	0	2	2
G60 Наследственная и идиопатическая невропатия	0	2	2

Примечание: n₁, n₆, n₁₂ — числа В₁-, В₆, В₁₂-зависимых белков, соответственно.

назы, причём стимуляция активности этого фермента приводила к уменьшению повреждения миелиновых оболочек (по данным МРТ) и улучшению неврологического состояния пациентов [9]. Сниженная активность транскетолазы нарушает метаболизм аксонов и миелин-синтезирующих клеток ЦНС [10].

Витамин В₆ и синтезируемый на его основе кофактор **пиридоксаль-5-фосфат (ПЛФ)** взаимосвязаны с биологическими активностями таких белков, как альбумин (ген PRO1341), и ферментами аспартат аминотрансфераза (ген GOT2) и глутамин синтетаза (ген GLUL). *Альбумин сыворотки* крови является белком-транспортёром кофактора ПЛФ и является существенным компонентом белковой фракции миелина [11]. Витамин В₆ тормозит гликирование альбумина и, кроме того, необходим для регуляции экспрессии гена альбумина [12].

ПЛФ-зависимый фермент *митохондриальная аспартат аминотрансфераза* катализирует трансаминирование кинуренина (метаболит L-триптофана) с образованием кинуреновой кислоты. Фермент также усиливает всасывание длинноцепочечных жирных кислот, что принципиально необходимо для синтеза миелиновой оболочки [13].

Низкая обеспеченность организма **витаминами В₆ и В₁₂** приводит к нарушениям метилирования ДНК, что снижает экспрессию гена глутамин синтетазы [14]. Сниженные уровни и активность фермента приводят к падению уровней нейротрофического фактора мозга и увеличивает апоптоз клеток, миелинизирующих аксоны в ЦНС [15]. При моделировании экспериментального аллергического энцефаломиелита обнаружен повышенный оксидантный стресс в сочетании со сниженной активностью фермента глутамин синтетазы [16].

Заключение

В неврологической практике комбинация витаминов В₁, В₆ и В₁₂ используется для лечения демиелинизирующих заболеваний уже более 40 лет. В течение последних 20 лет данное сочетание витаминов используется для обезвреживания гомоцистеина. Однако как показывают результаты настоящего исследования, синергизм витаминов В₁, В₆ и В₁₂ не ограничивается только лечением демиелинизирующих заболеваний и гипергомоцистеинемии.

Так, «тройственный синергизм» необходим для профилактики анемии (в т. ч. мегалобластной), врождённых аномалий развития, нарушений метаболизма аминокислот и фолатов. Парное синергидное сочетание «В₁ + В₁₂» профилактирует расстройства метаболизма аминокислот с разветвлённой цепью и липидов (диагнозы группы E71). Синергидное сочетание «В₁ + В₆» важно для профилактики дистрофии мышц, энцефалопатии, нарушений углеводного обмена. Синергидное сочетание «В₆ + В₁₂» важно для профилактики наследственной и идиопатической невропатии (G60), нарушений метаболизма порфирина и билирубина (E80) и нарушений эритропоэза, приводящих к анемии.

Таким образом, результаты протеомного анализа позволяют утверждать, что препараты, в которые входят все три витамина, будут обладать существенно большим клиническим потенциалом, чем парные сочетания витаминов и, тем более, моноформы витаминов. Следует отметить, что, вопреки широко распространяемому заблуждению о том, что витамин В₁₂ якобы «вызывает рак», сочетание фолатов с витамином В₁₂ улучшают выживание пациентов с опухолями, проходящих курс химиотерапии антифолатным препаратом

пеметрекседом [17]. Такие производные витамина В₁₂, как нитрозилкобаламин [18] и метилкобаламин [19], вообще проявляют выраженные противоопухолевые эффекты, инициируют апоптоз раковых клеток (тем самым тормозя рост опухолей) и повышают выживаемость.

Синергидное сочетание витаминов В₁, В₆ и В₁₂ представлено в препарате «Нейробион» (тиамина дисульфид — 100 мг, пиридоксина гидрохлорид — 200 мг, цианокобаламина — 200 мкг) показало свою

эффективность при лечении люмбаго с ишиасом (М54.4), межреберной невропатии (G58.0), пораженный лицевого нерва (G51), невралгии тройничного нерва (G50.0) и др. В соответствии с результатами настоящего исследования спектр клинических применений Нейробиона значительно шире и включает, по меньшей мере, терапию мегалобластной анемии, идиопатической невропатии и энцефалопатий, связанных с нарушениями метаболизма аминокислот (что типично, например, для алкогольной энцефалопатии).

Литература

1. *Torshin I.Y., Gromova O.A.* Magnesium and pyridoxine: fundamental studies and clinical practice. Nova Science Publ.; 2011; 196.
2. *Рябов В.Г., Громова О.А.* Витамины, макро- и микроэлементы. ГэотарМед, М.: 2008; 674.
3. *Torshin I.Yu.* Sensing the change from molecular genetics to personalized medicine. Nova Biomedical Books, NY, USA, 2009, In “Bioinformatics in the Post-Genomic Era” series, ISBN 1-60692-217-0.
4. *Forny P., Froese D.S., Suormala T., Yue W.W., Baumgartner M.R.* Functional characterization and categorization of missense mutations that cause methylmalonyl-CoA mutase (MUT) deficiency. *Hum Mutat.* 2014 Dec; 35 (12): 1449–58.
5. *Ambrosch A., Dierkes J., Lobmann R., Kuhne W., Konig W., Luley C., Lehnert H.* Relation between homocysteinaemia and diabetic neuropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2001; 18 (3): 185–192.
6. *Midtun O., Hustad S., Schneede J., Vollset S.E., Ueland P.M.* Plasma vitamin B-6 forms and their relation to transsulfuration metabolites in a large, population-based study. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86 (1): 131–138.
7. *Bettendorff L., Wins P., Lesourd M.* Subcellular localization and compartmentation of thiamine derivatives in rat brain. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1222 (1): 1–6.
8. *Fournier H., Butterworth R.F.* Effects of maternal thiamine deficiency on the development of thiamine-dependent enzymes in regions of the rat brain. *Neurochem Int.* 1989; 15 (4): 439–444.
9. *Kimura S., Ohtuki N., Nezu A., Tanaka M., Takeshita S.* Clinical and radiologic improvements in mitochondrial encephalomyelopathy following sodium dichloroacetate therapy. *Brain Dev.* 1997; 19 (8): 535–540.
10. *Sterzel R.B., Semar M., Lonergan E.T., Treser G., Lange K.* Relationship of nervous tissue transketolase to the neuropathy in chronic uremia. *J Clin Invest.* 1971; 50 (11): 2295–2304.
11. *Roomi M.W., Ishaque A., Khan N.R., Eylar E.H.* Glycoproteins and albumin in peripheral nerve myelin. *J Neurochem.* 1978; 31 (1): 375–379.
12. *Oka T., Komori N., Kuwahata M., Okada M., Natori Y.* Vitamin B₆ modulates expression of albumin gene by inactivating tissue-specific DNA-binding protein in rat liver. *Biochem J.* 1995; 309 (Pt 1): 243–248.
13. *Isola L.M., Zhou S.L., Kiang C.L., Stump D.D., Bradbury M.W., Berk P.D.* 3T3 fibroblasts transfected with a cDNA for mitochondrial aspartate aminotransferase express plasma membrane fatty acid-binding protein and saturable fatty acid uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92 (21): 9866–9870.
14. *Almeida M.R., Mabasa L., Crane C., Park C.S., Venancio V.P., Bianchi M.L., Antunes L.M.* Maternal vitamin B₆ deficient or supplemented diets on expression of genes related to GABAergic, serotonergic, or glutamatergic pathways in hippocampus of rat dams and their offspring. *Mol Nutr Food Res.* 2016; 60 (7): 1615–24 doi.
15. *Rai N.K., Ashok A., Rai A., Tripathi S., Nagar G.K., Mitra K., Bandyopadhyay S.* Exposure to As, Cd and Pb-mixture impairs myelin and axon development in rat brain, optic nerve and retina. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013; 273 (2): 242–58 doi.
16. *Castegna A., Palmieri L., Spera I., Porcelli V., Palmieri F., Fabis-Pedrini M.J., Kean R.B., Barkhouse D.A., Curtis M.T., Hooper D.C.* Oxidative stress and reduced glutamine synthetase activity in the absence of inflammation in the cortex of mice with experimental allergic encephalomyelitis. *Neuroscience.* 2011; 185: 97–105 doi.
17. *Yang T.Y., Chang G.C., Hsu S.L., Huang Y.R., Chiu L.Y., Sheu G.T.* Effect of folic acid and vitamin B12 on pemetrexed antifolate chemotherapy in nutrient lung cancer cells. *Biomed Res Int.* 2013;2013:389046. doi: 10.1155/2013/389046.
18. *Bauer J.A., Morrison B.H., Grane R.W., Jacobs B.S., Dabney S., Gamero A.M., Carnevale K.A., Smith D.J., Drazba J., Seetharam B., Lindner D.J.* Effects of interferon beta on transcobalamin II-receptor expression and antitumor activity of nitrosylcobalamin. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Jul 3; 94 (13): 1010–9.
19. *Shimizu N., Hamazoe R., Kanayama H., Maeta M., Koga S.* Experimental study of antitumor effect of methyl-B12. *Oncology.* 1987; 44 (3): 169–73.