

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ТИАМИНА И ЕГО ОКИСЛЕННЫХ ФОРМ

В.М. Завадская,¹ С.А. Лабор¹, В.И. Стенуро,² И.И. Стенуро¹

¹Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, 230017, Гродно, бул. Ленинского комсомола, 50, Беларусь; факс: +375 (152) 43-41-21, biophyz@bioch.basnet.by

²Гродненский государственный университет им. Янки Купалы, 230023, Гродно, ул. Ожешко, 22, Беларусь

Введение. Окислительный стресс играет ключевую роль в развитии многих патологических процессов и заболеваний, таких как воспаление, гипертония, диабет, нейродегенеративные заболевания. В литературе имеются многочисленные данные, что активные формы кислорода и азота активируют свободнорадикальные процессы в липидах клеточных мембран, окисляют липопroteины низкой плотности, вызывают повреждение биологически важных макромолекул. В то же время известно, что в условиях нормального метаболизма многие биохимические процессы протекают с участием свободных радикалов [1]. Однако ряд риск-факторов приводит к усиленной генерации свободных радикалов в условиях недостаточной антиоксидантной защиты организма, т.е. развитию окислительного стресса. Хотя антиоксидантная способность тиаминa пока ещё полностью не охарактеризована ряд экспериментальных фактов свидетельствуют о том, что тиамин может выступать в качестве антиоксиданта при окислительном и нитрозильном стрессе [2-5]. Применение высоких доз тиаминa может смягчить или задержать сосудистые осложнения у пациентов с сахарным диабетом. Тиамин (особенно бенфотиамин) предотвращает повреждение сосудов при сахарном диабете, предупреждает развитие нефропатий, снижает уровень токсических продуктов неэнзиматического гликозилирования белков [3]. Защитные свойства тиаминa при сахарном диабете нельзя объяснить только его коферментными свойствами, влиянием на метаболизм α -кетокислот и карбонильных соединений. Действительно, тиамин, его фосфорные эфиры ингибируют образование конечных продуктов гликозилирования белков также в опытах *in vitro*. В этом случае ингибирование неэнзиматического гликозилирования белков тиамином происходит в отсутствие ферментов. Одним из возможных механизмов защитного действия тиаминa является его взаимодействие с пероксинитритом и диоксидом азота с образованием тиохрома и оксодигидротиохрома [3]. Минорная трициклическая форма тиаминa легко окисляется диоксидом азота в тиохром, который затем, в свою очередь окисляется диоксидом азота в оксодигидротиохром. В конечном итоге, одна молекула тиаминa, которая находится в трициклической форме, восстанавливает четыре молекулы диоксида азота в нитрит [5]. Растворимость тиохрома в гидрофобной среде примерно в 100 раз выше, нежели растворимость тиаминa. Поэтому даже низкие концентрации тиохрома способны оказать защитный эффект на клеточные мембраны. Предварительный анализ имеющихся экспериментальных результатов позволяет заключить, что окисление тиаминa, сопряженное с окислением монофенольных соединений в реакциях, катализируемых пероксидазами и гемопroteинами в присутствии пероксидов является важным источником образования тиохрома и дисульфида тиаминa в живых организмах [5]. Целью работы является изучение реакций пероксидазного окисления тиаминa, катализируемого цитохромом *c* и миоглобином в присутствии пероксида водорода. Мы показали, что цитохром *c* из сердца быка, миоглобин из сердца лошади в присутствии пероксида водорода не только окисляют тиамин до тиохрома, но также эффективно окисляют тиохром до оксодигидротиохрома.

Материалы и методы. В работе использовали тиамин, тиаминмонофосфат, тиаминдифосфат, тиохром, парацетамол (ацетаминофен, N-ацетил-п-аминофенол), салициловая кислота, ферри-цитохром *c*, метмиоглобин, трет-бутилгидропероксид (Сигма, США); аминокислоты L- и D-тирозин, феррицианид и гемин (Fluka, США). Спектрально-

флуоресцентными методами и методом восходящей бумажной хроматографии определяли продукты трансформации тиамин и фенольных соединений [3,5].

Результаты и обсуждение.

Окисление тиамин в тиохром и оксидигидротиохром в пероксидазных реакциях катализируемых цитохромом с и миоглобином. Мы показали, что глобулярный гемопротейин - цитохром с, который локализован на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий и участвует в дыхании, окисляет тиамин в присутствии H_2O_2 до тиохрома (TChr), оксидигидротиохрома (ODTChr) и тиаминдисульфида. В гемовом кармане оксоферрильной формы цитохрома с (соединение I) молекула тиамин окисляется в TChr вследствие протекания двухэлектронной реакции с участием двух окислительных центров – оксоферрильного комплекса гема $Fe(IV=O)$ и π -катион радикала порфирина. Образовавшийся TChr, затем окисляется другой макромолекулой цитохрома с, которая находится в оксоферрильной форме (соединение I), в ODTChr также вследствие протекания реакций взаимосвязанного двухэлектронного переноса. TChr, в отличие от тиамин, обладает планарной структурой и легко проникает в гемовый карман оксоферрильной формы цитохрома с. Миоглобин – кислородосвязывающий белок скелетных мышц и мышцы сердца. Концентрация миоглобина, например, в кардиомиоцитах составляет около миллимоля. Известно, что миоглобин обладает пероксидазной активностью и может при миокардиальной ишемии вызывать повреждение биологических молекул, включая белки и липиды клеточных мембран. Мы показали, что тиамин ингибирует окисление триптофана, триптамина, мелатонина и ряда других индольных соединений в пероксидазной реакции, катализируемой метмиоглобином в присутствии пероксида водорода. Тиамин оказывает защитное действие на триптофанильные остатки макромолекулы миоглобина. Тиамин конкурирует с кислородом за свободные радикалы, локализованные на остатках триптофана, снижает образование пероксильных радикалов триптофана и, в конечном итоге, снижает выход формилкинурина и других продуктов деградации триптофана. Показано, что кислород расходуется в растворе вследствие протекания пероксидазной реакции окисления триптофана, катализируемой метмиоглобином в присутствии пероксида водорода. Реакция поглощения кислорода ингибируется при добавлении тиамин. В присутствии избытка пероксида водорода происходит разрушение гема миоглобина и высвобождение ионов железа. Однако генерация гидроксильных радикалов в реакции Фентона вносит незначительный вклад в образование тиохрома и оксидигидротиохрома. Окисление тиамин после добавления в раствор пероксида водорода и ионов железа составило примерно 1-2% от выхода тиохрома и оксидигидротиохрома в растворе содержащем, вместо ионов железа, метмиоглобин в такой же концентрации. Добавление в реакционную смесь (содержащую метмиоглобин, тиамин, пероксид водорода) ЭДТА, этанола или других алифатических спиртов мало сказывалось на выходе продуктов окисления тиохрома и оксидигидротиохрома. Представленные данные достаточно убедительно показывают, что с радикалами центрированными на остатках триптофана (предположительно С-3 атом углерода индольного кольца) взаимодействует тиамин. И этот атом углерода является центром, по которому наиболее, вероятно, присоединяются молекулы кислорода с образованием пероксильных радикалов. Присутствие свободных радикалов, локализованных на остатках триптофана вблизи поверхности белковой глобулы предполагает возможность окисления тиамин протекающего по другому механизму, а не только по пероксидазному механизму с участием иона железа.

Сопряжение окисления тиамин в тиохром с окислением фенолов в пероксидазной реакции катализируемой цитохромом с и миоглобином. После добавления тирозина или парацетамола к водным растворам, содержащим ферри-форму цитохрома с (или метмиоглобин) и пероксид водорода, наблюдали образование дитирозина или димера парацетамола. Образование дитирозина или димера парацетамола является доказательством генерации тирозильных радикалов или радикалов парацетамола в реакциях взаимодействия соответственно тирозина или парацетамола с оксоферрильными формами

цитохрома *c* и миоглобина. Фенольные соединения выступают в роли челноков обеспечивая перенос электронов от тиольной и трициклической форм тиамин до оксоферрильного комплекса гема. При достаточно высокой концентрации тиамина (больше 5 мМ) образования дитиозина не наблюдали, а выход тиохрома возрастал в 100-и более раз по сравнению с растворами в отсутствие фенолов. Увеличение выхода TChr и ингибирование образования ODTChr фенольными соединениями в пероксидазной реакции, катализируемой цитохромом *c*, или миоглобином, сопровождалось уменьшением образования димеров тирозина или димеров других монофенольных соединений

Заключение. В работе приведены экспериментальные результаты свидетельствующие, что антиоксидантные свойства тиамина и его фосфорных эфиров определяются протеканием реакций взаимодействия активных форм азота и кислорода с тиольной и трициклической формами тиамина, находящимися в равновесии с циклической формой тиамина с закрытым тиазоловым кольцом. Мы предполагаем, что защитные эффекты тиамина на клеточные мембраны могут быть связаны с тиольной формой тиамина и тиохромом, легко проникающим в гидрофобную липидную фракцию мембран. Суммируя полученные данные можно заключить, что антиоксидантный потенциал тиамина, реализуется через сопряжение окисления тиамина в тиохром в пероксидазных реакций, катализируемых цитохромом *c* и другими гемопroteинами, с окислением фенолов. Во-вторых, тиамин, взаимодействуя с долгоживущими тирозильными и триптофанильными радикалами белков, ингибирует реакции нитрования, ингибирует образование межбелковых сшивок с участием остатков тирозина, а также ингибирует реакции неэнзиматической пост-трансляционной модификации тирозильных и триптофанильных аминокислотных остатков полипептидной цепи активными формами азота, кислорода и активными формами галогенов [5]. Антиоксидантный потенциал тиамина необходимо оценивать по суммарному антиоксидантному эффекту минорных форм тиамина – трициклической, тиольной и продуктов окислительной трансформации тиамина – тиохрома и оксодигидротиохрома.

Полученные результаты, позволяют заключить, что гидрофобный метаболит тиамина – тиохром может выполнять важную антиоксидантную функцию в защите клеточных структур от повреждающего действия активных форм азота и кислорода [3,5]. Мы предполагаем, что тиохром будет более эффективно, нежели бенфотиамин предотвращать повреждение сосудов при сахарном диабете, предупреждать развитие нефропатий, снижать уровень токсических продуктов неэнзиматического гликозилирования белков.

Работа выполнена при поддержке фонда БРФФИ - грант № M13MC-020 и грант №M14-091.

Литература

1. Valko, M., et al.// Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007.Vol. **39**(1). P. 44-84.
2. Gibson G.E. and J.P. Blass// Thiamine-dependent processes and treatment strategies in neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal*, 2007.Vol. **9**(10). P. 1605-19.
3. Stepuro, I.I. //Thiamine and vasculopathies. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2005. Vol.**72**(2). P. 115-27.
4. Okai, Y., et al.// Potent radical-scavenging activities of thiamin and thiamin diphosphate. *J Clin Biochem Nutr*, 2007. Vol. **40**(1). P. 42-8.
5. Степуро И.И., Степуро В.И. //Окисленные производные тиамина. Механизмы образования под действием активных форм азота, кислорода и в реакциях, катализируемых гемопroteинами. 2014, LAP LAMBERT Academic Publishing, p. 280.

ANTIOXIDANT-PROPERTIES OF THIAMINE AND ITS OXIDIZED DERIVATIVES

V.M. Zavadskaya¹, S.A. Labor¹, V.I. Stsiapura², I.I. Stepuro¹

¹*Institute of Biochemistry NASB, BLK-50, Grodno, 230017, Belarus; biophys@bioch.basnet.by*

²*Y. Kupala State University of Grodno, ul. Ozheshko, 22, Grodno, 230023, Belarus*

The experimental results reported in this work demonstrate that antioxidant potential of thiamine should be assessed by taking into account the overall antioxidant effect of minor forms of thiamine – tricyclic, thiol – and thiamine oxidation products – thiochrome and oxodihydrothiochrome. We suppose that use of thiochrome may be more efficient than of benfothiamine in preventing nephropathies and vessel injuries at diabetes mellitus, decrease of toxic products level at nonenzymatic glycosylation of proteins.