

**С. А. Лабор<sup>1</sup>, В. И. Степура<sup>2</sup>, И. И. Степура<sup>1</sup>, В. Ю. Смирнов<sup>3</sup>**<sup>1</sup>*Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно, Республика Беларусь*<sup>2</sup>*Гродненский государственный университет им. Янки Купалы, Гродно, Республика Беларусь*<sup>3</sup>*Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь***ОКСОФЕРРИЛЬНЫЕ ФОРМЫ МИОГЛОБИНА  
И ГЕМОГЛОБИНА В ПРИСУТСТВИИ ФЕНОЛСОДЕРЖАЩИХ  
СОЕДИНЕНИЙ КАТАЛИЗИРУЮТ ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ  
ТРАНСФОРМАЦИЮ ТИАМИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ**

С помощью спектрально-флуоресцентных методов и метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) показано, что после инкубации тиамина с миоглобином и пероксидом водорода в водном растворе образуются тиохром, оксодигидротиохром и тиаминдисульфид.

При добавлении тирозина или парацетамола в раствор метмиоглобина, пероксида водорода и тиамина резко повышается выход тиохрома, а выход оксодигидротиохрома и тиаминдисульфида снижается. В присутствии высоких концентраций парацетамола или тирозина тиамин превращается в тиохром, а выход оксодигидротиохрома и тиаминдисульфида полностью ингибируется.

Тиаминмонофосфат и тиаминдифосфат, в отличие от тиамина, стабильны и не окисляются даже после длительной инкубации в смеси с метмиоглобином и пероксидом водорода. Фосфорные эфиры тиамина не окисляются в соответствующие фосфаты тиохрома в отсутствие монофенолов.

Образование димеров тирозина, а также димеров и олигомеров парацетамола замедляется в присутствии тиамина и его фосфорных эфиров. Обсуждается механизм сопряженного окисления тиамина и его фосфорных эфиров с окислением монофенолов в пероксидазной реакции, катализируемой метмиоглобином и пероксидом водорода.

*Ключевые слова:* метмиоглобин, метгемоглобин, оксоферрильные формы, ферри-форма, оксодигидротиохром, тиаминдисульфид, тиохром, феноксильные радикалы, тиаминмонофосфат, тиаминдифосфат.

**S. A. Labor<sup>1</sup>, V. I. Stsiapura<sup>2</sup>, I. I. Stepuro<sup>1</sup>, V. Yu. Smirnov<sup>3</sup>**<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Republic of Belarus*<sup>2</sup>*Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Republic of Belarus*<sup>3</sup>*Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus***IN THE PRESENCE OF PHENOL-CONTAINING COMPOUNDS OXOFERRYL  
FORMS OF MYOGLOBIN AND HEMOGLOBIN CATALYZE OXIDATIVE TRANSFORMATION  
OF THIAMINE AND ITS DERIVATIVES**

Using HPLC, absorption and fluorescence spectroscopy methods it was shown that incubation of thiamine with myoglobin and hydrogen peroxide in aqueous solution resulted in formation of thiochrome, oxodihydrothiochrome, and thiaminedisulfide.

If tyrosine or paracetamol are present in incubation mixture besides metmyoglobin, hydrogen peroxide, and thiamine we observed significant growth of thiochrome yield and formation of oxodihydrothiochrome and thiaminedisulfide decreased. At high excesses of paracetamol or tyrosine the production of oxodihydrothiochrome and thiamine disulfide were inhibited and thiochrome was the only product of thiamine oxidation.

In comparison to thiamine, its phosphate esters (thiamine monophosphate and thiamine diphosphate) are stable in presence of metmyoglobin and hydrogen peroxide and even prolonged times of incubation did not lead to their oxidative transformations. However, addition of monophenol compounds to the incubation mixture leads to oxidation of thiamine phosphate esters to the corresponding thiochrome phosphates.

From the other side, formation of tyrosine dimers and oligomers is lowered down in presence of thiamine and its phosphate esters. Mechanism of coupled oxidation of thiamine and its phosphate esters with oxidation of monophenols in peroxidase reaction catalyzed by metmyoglobin and hydrogen peroxide is discussed.

*Keywords:* myoglobin, hemoglobin, hemoprotein, oxoferryl form, ferri-form, oxodihydrothiochrome, thiaminedisulfide, thiochrome, metmyoglobin, methemoglobin, tyrosine radicals, thiaminpirofosfat, thiamin diphosphate.

**Введение.** Результаты многочисленных исследований показали, что при взаимодействии пероксида водорода с гемопротейнами, в том числе с миоглобинами и гемоглобинами, формируются высокореакционные оксоферрильные формы гемопротейнов, которые окисляют биомолекулы и инициируют перекисное окисление липидов [1, 2]. Пероксид водорода образуется в организме как вследствие прямой неэнзиматической реакции дисмутации супероксидов, так и в результате реакции, катализируемой СОД, а также генерируется аминоксидазой и глюкозооксидазой. Кроме того, постоянно образуют пероксид водорода макрофаги, клетки эндотелия. Перекисное окисление липидов сопровождается образованием органических пероксидов [3, 4].

Следует отметить, что оксоферрильные формы гемопротейнов могут образовываться не только в реакциях с пероксидами, но и при взаимодействии с пероксинитритом [5].

Стационарная концентрация пероксида водорода в крови вследствие разрушения каталазой и глутатионпероксидазой при нормальных условиях не превышает 0,2 нМ. Однако даже под действием этой низкой концентрации пероксида водорода метгемоглобин (или гемоглобин) постоянно окисляется с образованием оксоферрильной формы гемоглобина с радикалом, локализованным на белковой глобуле.

Обе оксоферрильные формы гемоглобина (соединение I и соединение II) [6] обнаружены в крови при физиологических условиях. Концентрация пероксида водорода в крови и тканях сильно возрастает при патологических состояниях, например при ишемии-реперфузии, и может достигать 10 мкМ и выше в сердечной мышце при ишемии [7].

Цель работы – изучение сопряженного пероксидазного окисления тиамин и фенольных соединений, катализируемого оксоферрильными формами миоглобина лошади и оксоферрильными формами гемоглобина человека.

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали тиамин, тиохром тиаминмонофосфат, тиаминдифосфат, парацетамол и миоглобин из сердца лошади (фирма Sigma, США), аминокислоты: *L*- и *D*-тирозин, *D,L*-аргинин, *D,L*-гистидин, *D,L*-валин, *D,L*-фенилаланин, *L*-серин, *D*-аспарагиновая кислота, *D,L*-треонин, а также феррицианид и гемин (Fluka, США). Все другие реагенты высокой очистки производства России и Беларуси.

Продукты окислительной трансформации тиамин, полученные после инкубации тиамин с метмиоглобином в присутствии пероксида водорода, разделяли на индивидуальные соединения на хроматографе Agilent-1100, сорбент Zorbax-extend-C18.

Оксигемоглобин получали из свежей донорской крови по известному методу [8]. Количество оксигемоглобина в растворе определяли, используя молярные коэффициенты поглощения  $\epsilon_{412} = 125\,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$  или  $\epsilon_{542} = 14\,250 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ . Метгемоглобин получали путем добавления 10–20-кратного молярного избытка феррицианида к оксигемоглобину. От избытка низкомолекулярных соединений отделялись методом гельфильтрации на сефадексе *G*-25. Концентрацию метгемоглобина определяли, используя молярный коэффициент поглощения  $\epsilon_{630} = 3700 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$  (рН 7,2). Оксоферрильные формы гемоглобина получали, добавляя 100–1000-кратные молярные избытки пероксида водорода к метгемоглобину. Полоса Сорс метгемоглобина с максимумом при 407 нм ( $\epsilon_{407} = 190\,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ ) после добавления пероксида водорода смещалась до 418 нм ( $\epsilon_{418} = 110\,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ ), рН 7,5. Концентрацию метгемоглобина и оксоферрильных форм гемоглобина в растворе определяли с помощью метода наименьших квадратов, разделяя спектр поглощения смеси на индивидуальные спектры. В качестве стандартов использовали спектры поглощения метгемоглобина и оксоферрильной формы гемоглобина. Концентрацию метмиоглобина в нейтральной или слабокислой среде определяли, измеряя оптическую плотность при 408 и 630 нм ( $\epsilon_{408} = 188\,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ ,  $\epsilon_{630} = 3900 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ ), а при значении рН 9,5 использовали коэффициент поглощения для полосы Сорс с максимумом при 411 нм ( $\epsilon_{411} = 119\,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ ) [9]. Концентрацию оксоферрильных форм миоглобина определяли, измеряя поглощение при 421 нм ( $\epsilon_{421} = 111\,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ ) [10].

К раствору метмиоглобина (1–10 мкМ) добавляли 100–1000-кратный молярный избыток  $\text{H}_2\text{O}_2$  в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,0). После смешивания компонентов через 5–10 мин инкубации контролировали спектрофотометрически полноту образования оксоферрильной формы по положению полосы Сорс. Избыток  $\text{H}_2\text{O}_2$  разрушали, добавляя в раствор каталазу.

Концентрацию пероксида водорода определяли спектрофотометрически, используя молярные коэффициенты поглощения при 240 нм ( $\epsilon_{240} = 39,4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ ) [11], концентрацию пероксида водорода в водных растворах – добавляя избыток KI, концентрацию образовавшегося молекулярного йода – используя коэффициент молярной экстинкции  $26\,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ .

Дитиозин получали путем добавления к 2 мМ тирозина 10 мкМ метмиоглобина и 2 мМ пероксида водорода. Реакцию проводили в 0,05 М фосфатном буфере (pH 7,5). После 30-минутной инкубации в реакционную смесь добавляли пероксид водорода и снова инкубировали при комнатной температуре. Образование дитиозина контролировали спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения  $\epsilon_{315} = 5000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$  (pH 7,5) [12], а также флуоресцентным методом. Возбуждение флуоресценции проводили при длине волны 315 нм, а интенсивность флуоресценции измеряли при 410 нм [13].

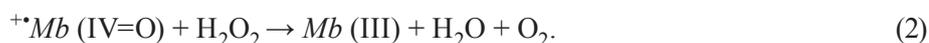
Концентрацию тиохрома определяли флуоресцентным методом (длина волны возбуждения 365 нм, длина волны флуоресценции 450 нм). В качестве стандарта использовали коммерческий тиохром фирмы Sigma (США) [14].

Измерения концентраций ферри- и оксоферрильных форм миоглобина и гемоглобина осуществляли на спектрофотометре Cary-100 (США), измерения бифенольной флуоресценции и флуоресценции тиохрома – на спектрофлуориметре SM2203 («Солар», Беларусь).

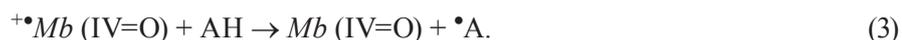
**Результаты и их обсуждение.** После смешивания метмиоглобина с пероксидом водорода наблюдали образование оксоферрильных форм миоглобина  ${}^{+}\text{Mb} (\text{IV}=\text{O})$  (соединение I), которые легко регистрируются спектрофотометрически [2]:



Один эквивалент окислителя расходуется на образование оксоферрильной формы гема ( $\text{Mb} (\text{IV}=\text{O})$ ), а другой эквивалент окислителя расходуется на образование порфиринового катиона  $\pi$ -радикала [15]. При избытке пероксида водорода относительно концентрации гемопротейна белок проявляет каталазную активность, т. е. оксоферрильная форма  ${}^{+}\text{Mb} (\text{IV}=\text{O})$  может реагировать с другой молекулой пероксида водорода с образованием метмиоглобина и кислорода (реакция 2):



В присутствии доноров электронов образуется соединение II:



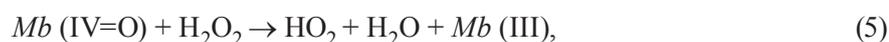
В отсутствие легкоокисляющихся субстратов AH, являющихся донорами электронов, происходит быстрый перенос электронов с аминокислотных остатков тирозина на порфирин-радикал с образованием тирозильных радикалов, которые аутоокисляются в долгоживущие орто-семихинонные радикалы тирозина. Тирозин-103 в миоглобине находится вблизи гема миоглобина и поэтому с наибольшей вероятностью образуется свободный радикал, центрированный на этом остатке [16]. Кроме того, вследствие внутримолекулярного переноса электрона на порфирин-радикал образуется свободный радикал на остатке тирозина-151 [17].

Позднее было показано, что пероксильный радикал формируется на 3-м атоме углерода индольного кольца остатка Trp-14 оксоферрильной формы [18].

Оксоферрильная форма миоглобина (соединение I), захватывает электрон с близлежащих функциональных групп с образованием свободнорадикальной формы метмиоглобина  ${}^{\bullet}\text{Mb} (\text{IV})$ , у которой свободные радикалы центрированы на тирозильных или триптофанильных остатках:



При взаимодействии  $\text{Mb} (\text{IV}=\text{O})$ , а также  ${}^{\bullet}\text{Mb} (\text{IV}=\text{O})$  с пероксидом водорода образуются супероксид-анионы:



Образование супероксиданиона способно привести к деградации гема [19]. Коэффициент молярной экстинкции для полосы Соре оксоферрильных форм миоглобина ниже, нежели для полосы Соре метмиоглобина. Оксоферрильные формы миоглобина под действием пероксида водорода восстанавливались до метмиоглобина. Это приводит к расходованию пероксида водорода в реакциях взаимодействия с гемопротеином. Процесс восстановления оксоферрильных форм миоглобина в метмиоглобин под действием пероксида водорода описывается реакциями 2–6. После добавления пероксида водорода для метгемоглобина протекают такие же процессы, как и в случае метмиоглобина.

Нами показано, что в присутствии тиаминна наблюдается возрастание скорости трансформации оксоферрильных форм гемопротеинов в ферри-формы. Процесс восстановления оксоферрильных форм миоглобина или гемоглобина сопровождался окислением тиаминна с образованием тиохрома, оксидигидротиохрома и тиаминдисульфида. Результаты измерений для метмиоглобина представлены в табл. 1.

Таблица 1. Выход продуктов окисления тиаминна (Т) в пероксидазной реакции, катализируемой метмиоглобином (метМб), в зависимости от концентрации тиаминна и времени инкубации  
Table 1. The yield of the products of oxidation of thiamine (T) in the peroxidase reaction catalyzed by metmyoglobin (metMb) depending on the concentration of thiamine and incubation time

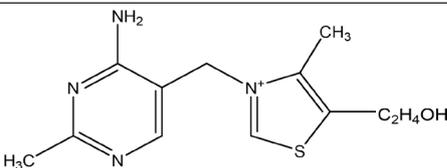
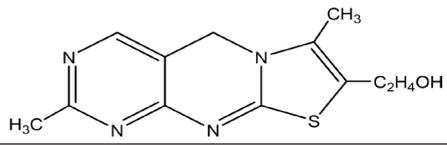
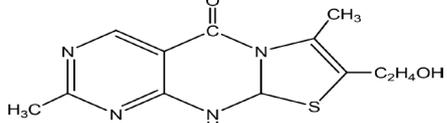
Состав раствора	Время инкубации, ч	ОДТх, мкМ	Тх или Тх-ФФ, мкМ
МетМб (10 мкМ) + Т (1 мМ) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 мМ)	0,5	–	0,7
МетМб (10 мкМ) + Т (5 мМ) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 мМ)	0,5	0,2	10
МетМб (10 мкМ) + Т (5 мМ) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 мМ)	24	144	15
МетМб (10 мкМ) + Т (5 мМ) + парацетамол (0,1 мМ) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 мМ)	0,5	12	275
МетМб (10 мкМ) + Т (5 мМ) + парацетамол (1,0 мМ) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 мМ)	0,5	–	310
МетМб (10 мкМ) + тиаминдифосфат (0,1 мМ) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 мМ)	2,0	–	> 0,15
МетМб (10 мкМ) + тиаминдифосфат (0,1 мМ) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 мМ) + парацетамол (0,1 мМ)	2,0	–	6,82

Тиохром, оксидигидротиохром и тиаминдисульфид были идентифицированы методом восходящей хроматографии на бумаге и методом ВЭЖХ.

Время удерживания соединений-стандартов – тиохрома, оксидигидротиохрома, тиаминдисульфида – хорошо совпадало со временем удерживания соединений, полученных после инкубации тиаминна в растворах, содержащих метмиоглобин и пероксид водорода.

Структурные формулы тиаминна и продуктов окислительной трансформации тиаминна, а также их время удерживания при проведении хроматографии методом ВЭЖХ приведены в табл. 2.

Таблица 2. Структурные формулы тиаминна и продуктов его окислительной трансформации и соответствующее время их удерживания на ВЭЖХ хроматограмме  
Table 2. Structural formulas of thiamine and products of its oxidative transformation. Retention times (R<sub>t</sub>) of the compounds on HPLC chromatogram are also shown

Структурная схема	Название соединения
	Тиамин (Т) R <sub>t</sub> = 9,72 мин
	Тиохром (Тх) R <sub>t</sub> = 25,06 мин
	Оксидигидротиохром (ОДТх) R <sub>t</sub> = 29,47 мин

Окончание табл. 2

Структурная схема	Название соединения
	Тиаминдисульфид (TS-ST) $R_t = 37,28$ мин
	Тиольная форма тиамин (TSH)
	Трициклическая форма тиамин (ТФТ)

Нами показано, что в присутствии тиамин скорость трансформации оксоферрильных форм гемопротеинов в ферри-формы возрастает. Тиохром обладает интенсивной флуоресценцией, поэтому его образование легко измерить флуоресцентным методом.

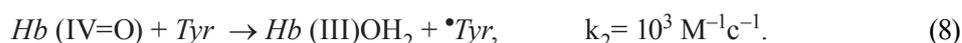
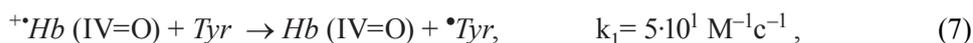
Однако выход тиохрома после инкубации тиамин с ферри-формами гемопротеинов в присутствии пероксида водорода был низок (см. табл. 1).

Тиаминмонофосфат и тиаминдифосфат практически не проникают в гемовый карман оксоферрильных форм гемопротеинов, и выход фосфатов тиохрома незначителен. В табл. 1 приведена концентрация образовавшегося тиохромдифосфата после инкубации в течение 2,0 ч тиаминдифосфата с пероксидом водорода и метмиоглобином.

После добавления фенола к водным растворам, содержащим тиамин и оксоферрильные формы гемопротеинов, резко возрастал выход тиохрома, который являлся в этом случае практически единственным продуктом, ответственным за флуоресценцию. При высоких концентрациях фенола выход тиохрома для раствора, содержащего тиамин, метмиоглобин и пероксид водорода, возрастал более чем в 120 раз по сравнению с растворами без фенола (рис. 1).

Тирозин и тирамин также на 1–2 порядка усиливали катаболизм тиамин (табл. 3). В спектре поглощения смеси, содержащей метмиоглобин, тиамин, *L*-тирозин и пероксид водорода, наблюдали образование тиохрома, который имел полосу поглощения при 365 нм в нейтральной среде (рис. 2). После добавления в раствор тирозина выход тиохрома возрастал от 0,15 до 5,8 мкМ (табл. 3).

Тирозин легко проникал в гемовый карман метгемоглобина и восстанавливал оксоферрильный катион в ферри-катион, а радикал, локализованный на порфириновом цикле, – до нейтральной молекулы порфирина [20]. В результате этих реакций молекула тирозина окислялся с образованием тирозильного радикала:



Ранее показано, что образование тиохрома происходит вследствие взаимодействия тирозильных радикалов с трициклической формой тиамин (ТФТ), а образование тиаминдисульфида – вследствие взаимодействия тирозильных радикалов с тиольной формой (TSH) тиамин (реакции 9 и 10) [2]:



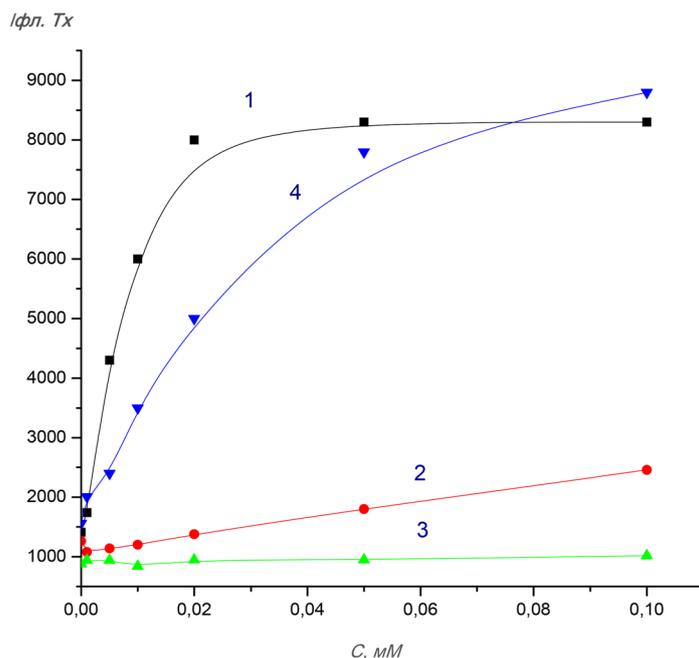


Рис. 1. Кинетика образования тиохрома после инкубации тиаминa с метмиоглобином, пероксидом водорода в зависимости от концентрации фенольных соединений в растворе. Концентрация метгемоглобина – 10 мкМ, тиаминa и пероксида водорода – 1,0 мМ. 1 – парацетамол, 2 – *L*-тирозин, 3 – салициловая кислота, 4 – фенол. Время инкубации растворов – 1 ч

Fig. 1. Dependence of thiochrome formation kinetics on concentration of phenolic compounds in solution. 1 mM thiamine was incubated with 10 μM metmyoglobin, 1 mM hydrogen peroxide and paracetamol (1), *L*-tyrosine (2), salicylic acid (3), or phenol (4). Incubation time of the solutions – 1 hour

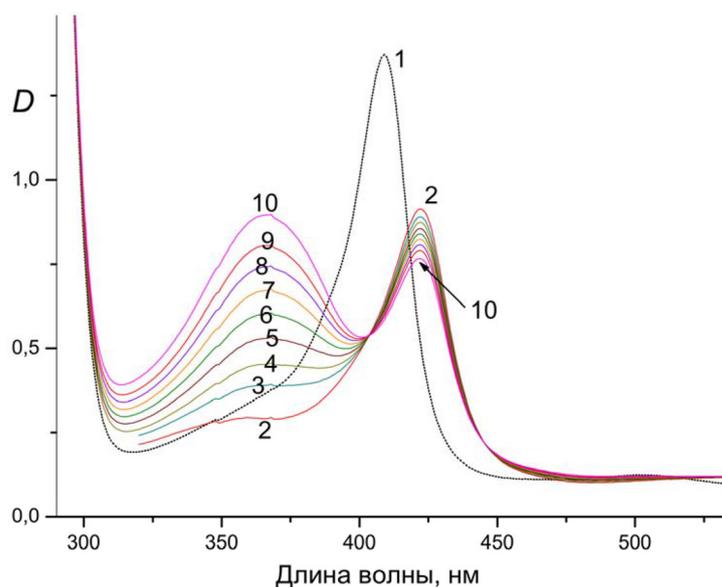


Рис. 2. Спектр поглощения смеси, содержащей метмиоглобин, тиамин, *L*-тирозин в отсутствие (1) и в присутствии (2–10) пероксида водорода в зависимости от времени инкубации раствора. Каждую последующую запись спектра поглощения раствора производили через 6 мин. Концентрации метмиоглобина – 10 мкМ, тиаминa – 1 мМ, тирозина – 1 мМ, пероксида водорода – 5 мМ (0,05 М калий фосфатный буфер, pH 7,5)

Fig. 2. Absorption spectrum of the mixture containing metmyoglobin, thiamine, *L*-tyrosine in the absence (1) and presence of hydrogen peroxide (2–10) depending on incubation time of the solution. Time interval between recordings of the absorption spectra – 6 min. 10 μM metmyoglobin was incubated with 1 mM thiamine, 1 mM tyrosine, 5 mM hydrogen peroxide in 0.05 M potassium phosphate buffer pH 7.5

Таблица 3. Изменение выхода тиохрома после инкубации тиамин с гемоглобином, пероксидом водорода в присутствии фенольных соединений и аминокислот. Концентрация метгемоглобина – 1,0 мкМ, тиамин – 1,0 мМ, фенольного соединения или аминокислоты – 2,0 мМ, пероксида водорода – 2,0 мМ (рН растворов 7,0 ± 0,5)

Table 3. Thiochrome production after thiamine incubation with hemoglobin, hydrogen peroxide in the presence of phenolic compounds and amino acids. Concentration of metmyoglobin – 1.0 μM, thiamine – 1.0 mM, phenolic compounds or amino acids – 2.0 mM, hydrogen peroxide – 2.0 mM (pH 7.0 ± 0.5)

Состав инкубационной смеси	Выход тиохрома, мкМ
МетНб + тиамин + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,15
МетНб + тиамин + L-валин + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,15
МетНб + тиамин + DL-аргинин + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,11
МетНб + тиамин + ацетилсалициловая кислота + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,32
МетНб + тиамин + салициловая кислота + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,45
МетНб + тиамин + D-тирозин + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5,80
МетНб + тиамин + тирамин + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4,80
МетНб + тиамин + фенол + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	8,10
МетНб + тиамин + парацетамол + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	12,2
МетНб + тиамин + дофамин + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,01
МетНб + тиамин + кверцетин + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,02

В присутствии парацетамола, тирозина, фенола эффективно протекает также окисление фосфорных эфиров тиамин – тиаминмонофосфата и тиаминдифосфата в соответствующие тиохром фосфаты (табл. 1). Образование фосфатов тиохрома протекает под действием феноксильных радикалов. Поэтому низкая проницаемость фосфатов тиамин совершенно не сказывается на скорости их окисления в соответствующие фосфаты тиамин в присутствии монофенолов. Например, выход тиохром фосфатов, образованных в растворе после инкубации тиаминдифосфата с миоглобином и пероксидом водорода и парацетамолом, сравним по порядку величин с выходом тиохрома, образованного после инкубации тиамин с миоглобином, пероксидом водорода и парацетамолом (табл. 1, 3).

Тирозильные радикалы взаимодействуют между собой и образуют димер – дитирозин (реакция 11):



Структурная формула дитирозина приведена на рис. 3. На спектре поглощения дитирозина в нейтральной и щелочной средах длинноволновой максимум расположен при 315 нм (рис. 4).

Ранее методом ВЭЖХ нами показано, что низкие концентрации метмиоглобина в присутствии пероксида водорода катализируют полимеризацию парацетамола [21]. Реакция полимеризации парацетамола, в отличие от тирозина, не останавливается на стадии образования димеров. Кроме димеров происходит образование тримеров, тетрамеров парацетамола, что сопровождается снижением выхода флуоресценции и длинноволновым сдвигом максимума поглощения в абсорбционном спектре реакционной смеси. Молекулярные веса димеров и олигомеров парацетамола определены с использованием с квадрупольно-времяпролетного tandemного масс-спектрометрического детектора Q-TOF 6550 в режиме ионизации-электрораспыления (ESI) [21].

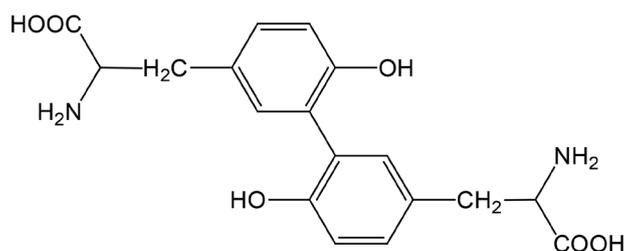


Рис. 3. Структурная формула дитирозина

Fig. 3. Dityrosine structure

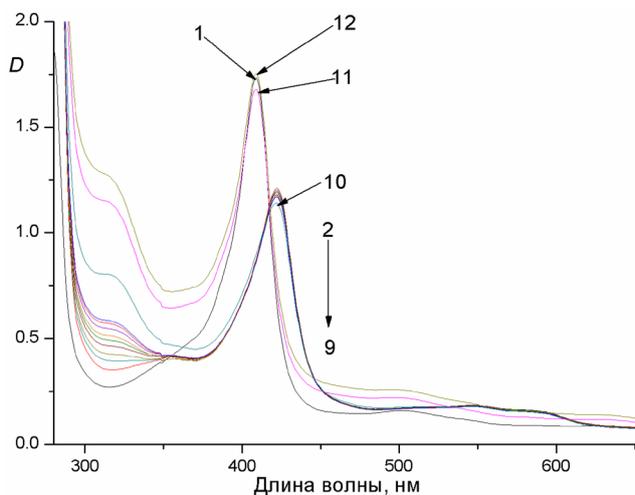


Рис. 4. Спектры поглощения метмиоглобина и тирозина до (1) и после (2–12) смешивания с пероксидом водорода.

Интервалы записи спектров поглощения:

2–9 – через 5 мин, 10 – через 2 ч, 11 – через 4 ч, 12 – через сутки. Концентрация метмиоглобина – 10 мкМ, тирозина – 4 мМ,  $H_2O_2$  – 1 мМ

Fig. 4. Absorption spectra of 10  $\mu$ M metmyoglobin and 4 mM tyrosine before (1) and after mixing with 1 mM hydrogen peroxide (2–12). Absorption spectra 2–9 were recorded with time interval 5 min, 10 – 2 hours, 11 – 4 hours, 12 – 24 hours

окислительных превращений даже после длительной инкубации в смеси с метмиоглобином и пероксидом водорода. Образование тиохром-фосфатов наблюдали только после инкубации фосфорных эфиров тиамин с метмиоглобином и пероксидом водорода в присутствии парацетамола или других монофенолов (см. табл. 1).

Т а б л и ц а 4. Уменьшение выхода дитирозина после инкубации тиамин с миоглобином, пероксидом водорода в зависимости от концентрации тиамин в растворе. Концентрация метмиоглобина – 1,0 и 10,0 мкМ, L-тирозина – 1,0 мМ, пероксида водорода – 1,0 мМ (pH 7,0  $\pm$  0,5)

Table 4. Decrease in dityrosine formation after thiamine incubation with myoglobin, hydrogen peroxide, depending on concentration of thiamine in the solution. Concentration of metmyoglobin – 1.0 and 10.0  $\mu$ M, L-tyrosine – 1.0 mM, hydrogen peroxide – 1.0 mM (pH 7.0  $\pm$  0.5)

Состав раствора	Концентрация дитирозина, мкМ	Концентрация тиохрома, мкМ	Концентрация тиамин-дисульфида
МетМб (0,1 мкМ) + L-тирозин + $H_2O_2$ (1 мМ)	72	–	
МетМб (0,1 мкМ) + L-тирозин + Т (0,01 мМ) + $H_2O_2$	69	1,5	0,1
МетМб (0,1 мкМ) + L-тирозин + Т (0,1 мМ) + $H_2O_2$	58	7,5	2,0
МетМб (0,1 мкМ) + L-тирозин + Т (0,5 мМ) + $H_2O_2$	49	22,5	10,0
МетМб (0,1 мкМ) + L-тирозин + Т (1,0 мМ) + $H_2O_2$	29	35	19
МетМб (0,1 мкМ) + L-тирозин + Т (5,0 мМ) + $H_2O_2$	11	60	90
МетМб (10 мкМ) + Т (1 мМ) + $H_2O_2$		0,45	

Мы предполагаем, что в окисление тиамин до тиохрома и тиаминдисульфида вносят небольшой вклад также и тирозильные радикалы, локализованные на поверхности белковой глобулы. Тирозильные радикалы образуются вследствие внутримолекулярного переноса электрона с тирозильных остатков белковых макромолекул к свободным радикалам, локализованным на порфириновых циклах гема. В результате внутримолекулярного переноса электрона порфириновые радикалы восстанавливаются, а на белке возникают долгоживущие тирозильные радикалы. Последние, вероятно, ответственны за образование следовых количеств тиохромдифосфата в отсутствие в реакционной смеси монофенола (табл. 1, предпоследняя строка).

Димеры парацетамола в основном ответственны за бифенильную флуоресценцию ( $\lambda_{\text{воз}} = 325$  нм,  $\lambda_{\text{фл}} = 425$  нм). Эти результаты находятся в хорошем соответствии с ранее полученными данными об ускорении полимеризации парацетамола под действием пероксидазы хрена и пероксида водорода [22].

Тиамин и его фосфорные эфиры в свою очередь ингибировали образование дитирозина или димеров и олигомеров фенольных соединений, например парацетамола [19, 21]. Выход дитирозина в присутствии тиамин снижался (табл. 4). Снижение образования дитирозина и возрастание выхода тиохрома свидетельствует о том, что в регенерации тирозильных радикалов наряду с тиольной формой тиамин участвует трициклическая форма тиамин, которая окисляется в тиохром.

Полученные результаты позволяют заключить, что вход тиамин в гемовый карман оксоферрильных форм гемопротеинов затруднен. Тиамин-монофосфат и тиаминдифосфат, в отличие от тиамин, еще более стабильны и практически не испытывают

Нами установлено, что пероксидазное окисление тиамин в присутствии монофенолов характеризуется большим ростом скорости окисления тиамин, в то время как в присутствии биофлавоноидов наблюдается четко выраженное ингибирование окисления тиамин. Например, отмечается активация пероксидазного окисления тиамин для фенолов, тирозина, тирамина, салициловой кислоты, парацетамола. Фенол, парацетамол, тирозин, тирамин на 1–2 порядка увеличивают выход продуктов окисления тиамин под действием оксоферрильных форм миоглобина или оксоферрильных форм гемоглобина. В данном случае реализуется регенерация фенола и других монофенольных соединений за счет окисления тиамин и его производных (реакции 8, 9).

Монофенольные соединения выступают в роли челноков, обеспечивая перенос электронов от тиольной и трициклической форм тиамин к оксоферрильному комплексу гема (реакции 7–10). При достаточно высокой концентрации тиамин (более 5 мМ) образования дитирозина не наблюдали. В этих условиях тирозильные радикалы полностью восстанавливались до молекул тирозина вследствие реакций 7 и 8.

В присутствии монофенольных соединений блокируется протекание реакций двухэлектронного окисления и оксодигидротирохром не образуется (табл. 1). Тирохром образуется вследствие протекания одноэлектронных реакций с радикалами тирозина или радикалами парацетамола (реакция 9).

В качестве челноков выступают также молекулы диоксида азота, обеспечивающие перенос электронов от тиольной и трициклической форм тиамин до оксоферрильного комплекса гема [23].

Кверцетин, диоксифенилаланин (ДОФА), биофлавоноиды, напротив, полностью ингибируют окисление тиамин (табл. 3). Высокая ингибирующая эффективность ДОФА, а также кверцетина, рутина и других биофлавоноидов отражает, во-первых, их большую реакционную способность при взаимодействии с оксоферрильным катионом гема, нежели у монофенолов. Под действием бифенолов очень эффективно происходит восстановление оксоферрильных форм гемопroteинов в ферри-формы. Во-вторых, свободные радикалы кверцетина, биофлавоноидов, вероятно, не способны регенерироваться за счет окисления молекул тиамин и поэтому для них не характерно сопряженное окисление совместно с тиамином.

**Заключение.** В данной работе нами показано, что при взаимодействии пероксида водорода с ферри-формами миоглобина лошади и гемоглобина человека формируются высокореакционные оксоферрильные формы гемопroteинов, которые окисляют тиамин до тирохрома, оксодигидротирохрома и тиаминдисульфида. Фенольные соединения на 1–2 порядка увеличивают выход тирохрома, но при высоких концентрациях практически полностью ингибируют окисление тиамин а образованием оксодигидротирохрома.

Полученные результаты позволяют заключить, что при окислительном стрессе, когда резко возрастают уровни активных форм кислорода и оксоферрильных форм гемопroteинов, монофенольные соединения усиливают катаболизм тиамин и тиаминдифосфата, окисляя их в тирохром и тиаминдисульфид и соответствующие фосфорные эфиры тирохрома или фосфорные эфиры дисульфида тиамин.

Снижение концентрации тиаминдифосфата при окислительном стрессе может вызывать ингибирование активности тиамин-зависимых ферментов и вносить дополнительный вклад в развитие патофизиологических процессов при окислительном стрессе.

Следовательно, при применении фенольных соединений, в том числе лекарств, содержащих монофенольные структуры (например парацетамола, особенно при длительном его использовании), необходимо дополнительное поступление в организм тиамин или его производных как для снижения токсического действия свободных радикалов парацетамола и продуктов его метаболизма, так и для ускорения разрушения пероксидов водорода и возмещения концентрации тиамин, окисленного в тирохром.

#### Список использованных источников

1. Взаимодействие оксоферрилмиоглобина и динитрозильных комплексов железа / К. Б. Шумаев [и др.] // Биохимия. – 2004. – Т. 69, № 5. – С. 699–705.
2. Тиамин ингибирует образование дитирозина, специфического маркера окислительного стресса, в реакциях, катализируемых оксоферрильными формами гемоглобина / А. И. Степура [и др.] // Биохимия. – 2008. – Т. 73, № 9. – С. 1281–1293.

3. Boveris, A. The cellular production of hydrogen peroxide / A. Boveris, N. Oshino, B. Chance // *Biochem. J.* – 1972. – Vol. 128, N 3. – P. 617–630.
4. Boveris, A. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen / A. Boveris, B. Chance // *Biochem. J.* – 1973. – Vol. 134, N 3. – P. 707–716.
5. Exner, M. Kinetic and mechanistic studies of the peroxynitrite – mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin / M. Exner, S. Herold // *Chem. Res. in Toxicol.* – 2000. – Vol. 13, N 4. – P. 287–293.
6. The globin-based free radical of ferryl hemoglobin is detected in normal human blood / D. A. Svistunenko [et al.] // *J. of Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, N 11. – P. 7114–7121.
7. Chance, B. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs / B. Chance, H. Sies, A. Boveris // *Physiol. Rev.* – 1979. – Vol. 59, N 3. – P. 527–605.
8. Affinity labeling of the polyphosphate binding site of hemoglobin / R. Benesch [et al.] // *Biochemistry.* – 1972. – N 11. – P. 3576–3582.
9. Antonini, E. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands / E. Antonini, M. Brunori. – Amsterdam: North-Holland Pub. Co., 1971. – 436 p. (Frontiers of Biology; vol. 21).
10. Fenwick, C. pH and driving force dependence of intramolecular oxyferryl heme reduction in myoglobin / C. Fenwick, A. M. English, J. F. Wishart // *J. of the Am. Chem. Soc.* – 1997. – Vol. 119, N 20. – P. 4758–4764.
11. Ostdal, H. Reduction of ferrimyoglobin by b-lactoglobulin / H. Ostdal, B. Daneshvar, L. H. Skibsted // *Free Radical Res.* – 1996. – Vol. 24, N 6. – P. 429–438.
12. Bayse, G. S. The peroxidase-catalyzed oxidation of tyrosine / G. S. Bayse, A. W. Michaels, M. Morrison // *Biochim. et Biophys. Acta (BBA)-Enzymol.* – 1972. – Vol. 284, N 1. – P. 34–42.
13. Anderson, S. O. Covalent cross-links in a structural protein, resilin / S. O. Anderson // *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum.* – 1966. – Vol. 263. – P. 1–83.
14. Stepuro, I. I. Thiamine and vasculopathies / I. I. Stepuro // *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* – 2005. – Vol. 72, N 2. – P. 115–127.
15. Raven, E. L. Chemical reactivity of the active site of myoglobin / E. L. Raven, A. G. Mauk // *Adv. Inorg. Chem.* – 2001. – Vol. 51. – P. 1–49.
16. Tew, D. The myoglobin protein radical coupling of Tyr-103 to Tyr-151 in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated cross-linking of sperm whale myoglobin / D. Tew, P. R. O. de Montellano // *J. of Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263, N 33. – P. 17880–17886.
17. Site-specific spin trapping of tyrosine radicals in the oxidation of metmyoglobin / R. M. Gunther [et al.] // *Biochem. J.* – 1988. – Vol. 330, N 3. – P. 1293–1299.
18. Peroxidation of a specific tryptophan of metmyoglobin by hydrogen peroxide / J. A. De Gray [et al.] // *Biochem. J.* – 1997. – Vol. 272, N 4. – P. 2359–2362.
19. Stepuro, I. I. Oxidized thiamine derivatives. Mechanisms of formation under exposure to reactive nitrogen and oxygen species and in hemoprotein – catalyzed reactions / I. I. Stepuro, V. I. Stepuro. – [S. l.]: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2014. – 280 p.
20. Herold, S. Nitrotyrosine, dityrosine, and nitrotryptophan formation from metmyoglobin, hydrogen peroxide, and nitrite / S. Herold // *Free Radical Biology and Medicine.* – 2004. – Vol. 36, N 5. – P. 565–579.
21. Лабор, С. А. Механизм окисления тиамин и его фосфорных эфиров в псевдопероксидазной реакции, катализируемой метмиоглобином, в присутствии парацетамола / С. А. Лабор // *Белорусские лекарства: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 17–18 нояб. 2016 г. / Нац. акад. наук Беларуси, Отд-ние химии и наук о Земле, Ин-т биоган. химии Нац. акад. наук Беларуси; редкол.: С. А. Усанов, Е. Н. Калинин, П. Т. Петров.* – Минск, 2016. – С. 116–123.
22. Potter, D. W. Identification of acetaminophen polymerisation products catalysed by horseradish peroxidase / D. W. Potter, D. W. Miller, J. A. Hinson // *Biol. Chem.* – 1985. – Vol. 290. – P. 12174–12180.
23. Oxidation of thiamine on reaction with nitrogen dioxide generated by ferric myoglobin and hemoglobin in the presence of nitrite and hydrogen peroxide / I. I. Stepuro [et al.] // *Biochemistry (Moscow).* – 2012. – Vol. 77, N 1. – P. 41–55.

## References

1. Shumaev K. B., Petrova N. E., Zabbarova I. V., Topunov A. F., Lankin V. Z., Ruuge E. K. Interaction of oxoferrylmyoglobin and dinitroaryl iron complexes. *Biochemistry (Moscow)*, 2004, vol. 69, no. 5, pp. 699–705. (in Russian).
2. Stepuro A. I., Adamchuk R. I., Oparin A. Yu., Stepuro I. I. Thiamine inhibits formation of dityrosine, a specific marker of oxidative injury, in reactions catalyzed by oxoferryl forms of hemoglobin. *Biochemistry (Moscow)*, 2008, vol. 73, no. 9, pp. 1281–1293. (in Russian).
3. Boveris A., Oshino N., Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*, 1972, vol. 128, no. 3, pp. 617–630.
4. Boveris A., Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*, 1973, vol. 134, no. 3, pp. 707–716.
5. Exner M., Herold S. Kinetic and mechanistic studies of the peroxynitrite – mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin. *Chemical Research in Toxicology*, 2000, vol. 13, no. 4, pp. 287–293.
6. Svistunenko D. A., Patel R. P., Voloshchenko S. V., Wilson M. T. The globin-based free radical of ferryl hemoglobin is detected in normal human blood. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, vol. 272, no. 11, pp. 7114–7121.
7. Chance B., Sies H., Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 1979, vol. 59, no. 3, pp. 527–605.
8. Benesch R., Benesch E., Renthall R., Maeda N. Affinity labeling of the polyphosphate binding site of hemoglobin. *Biochemistry*, 1972, no. 11, pp. 3576–3582.

9. Antonini E., Brunori M. *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands*. Amsterdam, Nort-Holland Pub. Co., 1971, 436 p., *Frontiers of Biology*, vol. 21.
10. Fenwick C. W., English A. M., Wishart J. F. pH and driving force dependence of intramolecular oxyferryl heme reduction in myoglobin. *Journal of the American Chemical Society*, 1997, vol. 119, no. 20, pp. 4758–4764.
11. Ostdal H., Daneshvar B., Skibsted L. H. Reduction of ferrimyoglobin by b-lactoglobulin. *Free Radical Research*, 1996, vol. 24, no. 6, pp. 429–438.
12. Bayse G. S., Michaels A. W., Morrison M. The peroxidase-catalyzed oxidation of tyrosine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 1972, vol. 284, no. 1, pp. 34–42.
13. Anderson S. O. Covalent cross-links in a structural protein, resilin. *Acta Physiologica Scandinavica, Supplementum*, 1966, vol. 263, pp. 1–83.
14. Stepuro I. I. Thiamine and vasculopathies. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2005, vol. 72, no. 2, pp. 115–127.
15. Raven E. L., Mauk A. G. Chemical reactivity of the active site of myoglobin. *Adv. Inorg. Chem.*, 2001, vol. 51, pp. 1–49.
16. Tew D., de Montellano P. R. O. The myoglobin protein radical coupling of Tyr-103 to Tyr-151 in the H202-mediated cross-linking of sperm whale myoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, vol. 263, no. 33, pp. 17880–17886.
17. Gunther R. M., Tschirret-Guth R. A., Witkowska H. E., Fann C. Y., Barr P. D., De Montellano P. R. O., Mason P. R. Site-specific spin trapping of tyrosine radicals in the oxidation of metmyoglobin. *Biochemical Journal*, 1988, vol. 330, no. 3, pp. 1293–1299.
18. DeGray J. A., Gunther M. R., Tschirret-Guth R., de Montellano P. R. O., Mason R. Peroxidation of a specific tryptophan of metmyoglobin by hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*, 1997, vol. 272, no. 4, pp. 2359–2362.
19. Stepuro I. I., Stepuro V. I. Oxidized thiamine derivatives. Mechanisms of formation under exposure to reactive nitrogen and oxygen species and in hemoprotein – catalyzed reactions, LAP LAMBERT Academic Publishing, 2014, 280 p.
20. Herold S. Nitrotyrosine, dityrosine, and nitrotryptophan formation from metmyoglobin, hydrogen peroxide, and nitrite. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, vol. 36, no. 5, pp. 565–579.
21. Labor S. A., Stepuro V. I., Smirnov V. Yu., Stepuro I. I., Shuriberko A. V., Yancevich A. V. Mechanism of oxidation of thiamine and its phosphate esters in pseudoperoxidase reaction catalyzed by metmyoglobin in the presence of paracetamol. *Materialy Mezhdunar. nauch.-prakt. konf. "Belorusskie lekarstva"* [Materials International Scientific and Practical Conference "Belarus drugs"], Minsk, 2016, pp. 116–123. (in Russian).
22. Potter D. W., Miller D. W., Hinson J. A. Identification of acetaminophen polymerisation products catalysed by horseradish peroxidase. *Biological Chemistry*, 1985, vol. 290, pp. 12174–12180.
23. Stepuro I. I., Oparin A. Y., Stsiapura V. I., Maskevich S. A., Titov V. Y. Oxidation of thiamine on reaction with nitrogen dioxide generated by ferric myoglobin and hemoglobin in the presence of nitrite and hydrogen peroxide. *Biochemistry (Moscow)*, 2012, vol. 77, no. 1, pp. 41–55.

### Информация об авторах

*Лабор Светлана Алексеевна* – аспирант, мл. науч. сотрудник. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (БЛК, 50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: swet.labor2010@yandex.by.

*Степуро Виталий Иванович* – канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотрудник, доцент. Гродненский государственный университет им. Янки Купалы (ул. Ожешко, 22, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: stsiapura@gmail.com.

*Степуро Иван Иванович* – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник, доцент. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (БЛК, 50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: scepura@gmail.com.

*Смирнов Виталий Юрьевич* – ст. науч. сотрудник, доцент. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: vit\_sm@mail.ru.

### Для цитирования

Оксоферрильные формы миоглобина и гемоглобина в присутствии фенолсодержащих соединений катализируют окислительную трансформацию тиамин и его производных / С. А. Лабор [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 2. – С. 55–65.

### Information about the authors

*Labor Svetlana Alekseevna* – Postgraduate student, Junior researcher. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (BLK, 50, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: swet.labor2010@yandex.by.

*Stsiapura Vitali Ivanovich* – Ph. D. (Phys. and Math.), Leading researcher, Assistant Professor. Yanka Kupala Grodno State University (22, Ozheshko Str., 230023, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: stsiapura@gmail.com.

*Stepuro Ivan Ivanovich* – Ph. D. (Biol.), Leading researcher, Assistant Professor. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (BLK, 50, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: scepura@gmail.com.

*Smirnov Vitaly Yurjevich* – Senior Researcher, Assistant Professor. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: vit\_sm@mail.ru.

### For citation

Labor S. A., Stsiapura V. I., Stepuro I. I., Smirnov V. Yu. In the presence of phenol-containing compounds oxoferryl forms of myoglobin and hemoglobin catalyze oxidative transformation of thiamine and its derivatives. *Vestsi Natsy-anal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], 2017, no. 2, pp. 55–65.