

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 577.322.9

DOI: 10.29235/1029-8940-2018-63-2-176-187

Поступила в редакцию 20.10.2017

Received 20.10.2017

**И. И. Степура¹, С. А. Лабор¹, А. В. Шуриберко¹, В. И. Степура²,
В. Ю. Смирнов³, А. В. Янцевич⁴**

¹Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно, Республика Беларусь

²Гродненский государственный университет им. Я. Купалы, Гродно, Республика Беларусь

³Гродненский медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь

⁴Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ТИАМИНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ОКСОФЕРРИЛЬНЫХ ФОРМ МИОГЛОБИНА

Аннотация. Окислительные превращения тиамин в присутствии метмиоглобина и пероксида водорода, в результате которых может образовываться ряд продуктов окисления, носят сложный характер. При инкубации тиамин с метмиоглобином и пероксидом водорода возможно расщепление молекулы тиамин по углероду метиленового мостика с образованием аминопиримидинового и тиазолового компонентов в виде отдельных молекул, а также образование тиохрома, тиаминдисульфида, оксодигидротиохрома, тиаминтиазолон.

Окислительная трансформация фосфатов тиамин при инкубации с метмиоглобином и пероксидом водорода приводит к образованию аналогичных продуктов, однако в этом случае тиаминазная активность, т. е. расщепление на пиримидиновый компонент и фосфат тиазола, значительно выше. Добавление тирозина или парацетамола ингибирует тиаминазную активность, а также образование дисульфида тиамин, но увеличивает выход тиохрома или фосфатов тиохрома.

С помощью спектрально-флуоресцентных методов, а также методов ВЭЖХ и масс-спектропии проведена идентификация продуктов окисления тиамин и фосфорных эфиров тиамин в пероксидазной реакции, катализируемой метмиоглобином в присутствии пероксида водорода. Обсуждается роль оксоферрильных форм миоглобин, образующихся при окислительном стрессе, в разрушении по тиаминазному пути тиаминдифосфата, который является коэнзимом важнейших ферментов энергетического метаболизма.

Ключевые слова: метмиоглобин, оксоферрильные формы миоглобин, тиамин, тиаминдифосфат, тиазоловый и пиримидиновый компоненты тиамин

Для цитирования: Тиаминазная активность оксоферрильных форм миоглобин / И. И. Степура [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2018. – Т. 63, № 2. – С. 176–187. DOI: 10.29235/1029-8940-2018-63-2-176-187

I. I. Stepuro¹, S. A. Labor¹, A. V. Shuryberka¹, V. I. Stsiapura², V. Yu. Smirnov³, A. V. Yantsevich⁴

¹Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Republic of Belarus

²Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Republic of Belarus

³Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

⁴Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

THIAMINASE ACTIVITY OF MYOGLOBIN OXOFERRYL FORMS

Abstract. Thiamine oxidation chemistry in presence of metmyoglobin and hydrogen peroxide is quite complex and different products can be formed.

Incubation of thiamine with metmyoglobin and hydrogen peroxide can result in splitting of thiamine molecule at carbon atom of the methylene bridge and production of aminopyrimidine and thiazole components as separate molecules or in formation of thiochrome, thiamine disulfide, oxodihydrothiochrome, and thiaminethiazolone.

Oxidative transformation of thiamine phosphate esters in presence of metmyoglobin and hydrogen peroxide gives similar products however thiaminase activity, i.e. splitting of the molecules into aminopyrimidine and thiazole phosphate parts, is much higher in this case. Addition of tyrosine or paracetamol to incubation mixture inhibits thiaminase activity and formation of disulfides, but yield of thiochrome or thiochrome phosphates increases.

Identification of products of thiamine (or its phosphate esters) oxidation in the presence of metmyoglobin and hydrogen peroxide was performed using HPLC, mass-spectrometry and spectral-fluorescent methods.

Role of oxoferryl forms of myoglobin in degradation of thiaminediphosphate, cofactor of the important enzymes of carbohydrate metabolism, by thiaminase mechanism is discussed.

Keywords: metmyoglobin, oxoferryl forms of myoglobin, thiamin, thiamin diphosphate, thiazole and pyrimidine components of thiamine

For citation: Stepuro I. I., Labor S. A., Shuryberka A. V., Stsiapura V. I., Smirnov V. Yu., Yantsevich A. V. Thiaminase activity of myoglobin oxoferryl forms. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2018, vol. 63, no. 2, pp. 176–187 (in Russian). DOI: 10.29235/1029-8940-2018-63-2-176-187

Введение. Тиамин (или витамин В₁) является важнейшим незаменимым фактором питания и с момента своего открытия известен как соединение, предотвращающее развитие болезни Бери-бери [1]. Более поздние исследования показали, что фосфорилированная форма тиаминдифосфат, является коэнзимом таких важнейших ферментов энергетического метаболизма, как пируватдегидрогеназа и α -кетоглутаратдегидрогеназа. Тиаминдифосфат также является кофактором транскетолазы, ключевого фермента пентозофосфатного цикла [2–4]. Кроме тиаминдифосфата в организме всегда содержится свободный тиамин и его фосфорные эфиры: тиаминмонофосфат, тиаминтрифосфат, которые выполняют собственные некоферментные функции, играют важную структурную роль и взаимодействуют с клеточными мембранами, увеличивая их стабильность [5]. Как известно, тиамин и трифосфат тиамин ответственны за передачу нервных импульсов, участвуют в регуляции проницаемости Na⁺-каналов в нервной ткани [6–8]. Кроме того, тиамин не только улучшает метаболические процессы в мозгу пациентов с болезнью Альцгеймера [9], а также с синдромом Вернике-Корсакова [5, 10], но и защищает клеточные структуры от повреждения в опытах *in vitro* [11], выступает в качестве антиоксиданта, например, в нервной ткани, при окислительном стрессе [12, 13]. Повреждение нервной ткани сопровождается усилением синтеза оксида азота, протеканием реакций нитрования тирозина с образованием 3-нитротирозина на фоне дефицита тиамин [14, 15].

Тиамин стабилен в кислой среде, но быстро разрушается в щелочной среде в присутствии кислорода, феррицианида, молекулярного йода и других окислителей с образованием тиаминдисульфида, тиохрома и других продуктов окисления. Тиамин также разрушается под действием рентгеновского и γ -излучения, УФ-излучения и ультразвука [16]. Среди продуктов фотолиза тиамин в кислой среде идентифицирован 2-метил-4-амино-5-амино-метилпиримидин [17]. Под действием сульфита тиамин расщепляется по метиленовому мостику с образованием пиримидинового и тиазолового компонентов [18]. Тиамин является эффективным скэвенджером гидроксильных радикалов [19], пероксинитрита [20] и окисляется с образованием тиохрома, оксидигидротиаохрома, тиаминдисульфида [16]. Показано, что тиамин разрушается под действием ряда других антиаминовых факторов ферментативной и неферментативной природы. Ферментативные антиаминовые факторы включают термолабильные тиаминазу I (ЕС 2.5.1.2) и тиаминазу II (ЕС 3.5.99.2). Тиамин I содержится в больших количествах во внутренностях карпа и других пресноводных рыб, а также в моллюсках [21, 22]. Расщепление молекулы тиамин под действием тиаминазы I сопровождается присоединением к метиленовой группе пиримидинового компонента азота или серосодержащих органических оснований [21]. Тиамин II гидролитически расщепляет тиамин на пиримидиновый и тиазоловый компоненты (обнаружена только среди микроорганизмов) [23].

Термостабильные антиаминовые факторы содержатся во многих продуктах растительного и животного происхождения [24–27]. Показано, что тиамин окисляется под действием катехинов, хинонов, флавоноидов, а также активных соединений, содержащихся в кофе или чае [26, 27]. После прекращения потребления чая содержание тиамин в организме быстро нормализуется. Добавление в продукты питания или фармацевтические препараты аскорбиновой кислоты предотвращает разрушение тиамин и способствует сохранению тиаминного статуса организма [27]. Общее количество тиамин во взрослом организме человека составляет примерно 30 мг. Скорость обмена тиамин в тканях организма человека достаточно велика, а время, в течение которого уровень тиамин снижается наполовину, составляет, по данным разных авторов, от 9 до 18 дней [28]. Сам тиамин в бактериальных и животных клетках активно метаболизируется. В моче крыс и человека выделено от 25 до 30 метаболитов тиамин. Тиаминуксусная, тиазолуксусная и пиримидинкарбоновая кислоты являются главными идентифицированными метаболитами тиамин в моче крыс и человека [29]. Важную роль в метаболизме тиамин играет алкогольдегидрогеназа. В опытах *in vitro* показано, что тиамин является хорошим субстратом для данного фермента, а 5- β -оксиэтильная группа тиазолового компонента витамина В₁ окисляется с большей скоростью, нежели этанол. Если тиамин присутствует в тканях в количествах, превышающих связывающую способность тиамин-зависимых ферментов, а также емкость физиологического депо организма, тиамин быстро экскретируется с мочой в свободной неизменной форме [30].

Рядом исследователей показано, что при взаимодействии пероксида водорода с гемопротейнами, в том числе с цитохромом *c*, формируются высокореакционные оксоферрильные формы гемопротейнов, которые окисляют многие биологически важные молекулы и инициируют перекисное окисление липидов [31–35].

Пероксид водорода образуется в организме как вследствие прямой неэнзиматической реакции дисмутации супероксидов, так и вследствие 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. Следует отметить, что оксоферрильные формы гемопротейнов могут образовываться не только в реакциях с пероксидами, но и при взаимодействии с пероксинитритом [36].

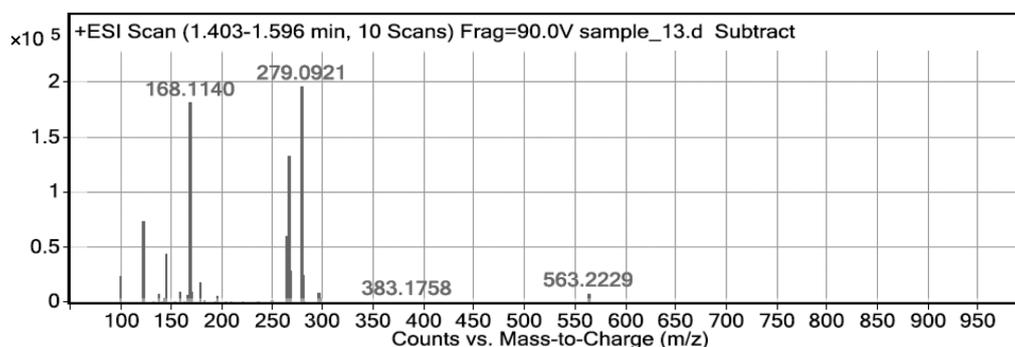
Стационарная концентрация пероксида водорода в крови при физиологических условиях не превышает 0,2 нМ вследствие разрушения каталазой и глутатионпероксидазой [37]. Однако даже под действием этой низкой концентрации пероксида водорода метгемоглобин (или гемоглобин) постоянно окисляется с образованием феррильной формы гемоглобина с радикалом, локализованным на белковой глобуле. Обе оксоферрильные формы гемоглобина – соединение I и соединение II – обнаружены в крови [38].

Концентрация пероксида водорода в крови и тканях сильно возрастает при патологических состояниях, например при ишемии-реперфузии, и может достигать в сердечной мышце при ишемии 10 мкМ и выше.

Целью данной работы являлось исследование окислительной трансформации тиамин и его фосфорных эфиров под действием метмиоглобина и пероксида водорода, а также идентификация продуктов окисления методами ВЭЖХ, флуоресцентной и масс-спектропии.

Материалы и методы исследования. В работе использовали тиамин, тиаминмонофосфат, тиаминдифосфат, тиохром, парацетамол, метмиоглобин из сердца лошади (Sigma, США), аминокислоты L- и D-тирозин, D,L-фенилаланин (Fluka, США), а также 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 соедине-



m/z	z	Интенсивность	Название молекулярного иона
262,09	1	60807,13	Тиохром (M)
265,11	1	133506,58	Тиамин (M + H ⁺)
265,12		40562,3	Тиамин (M + H ⁺)
267,14		29782,29	Тиамин (M + 2H ⁺)
279,09	1	197000,39	Оксодигидротиохром
280,09	1	25458,57	Тиаминтиазолон
563,22		7450	Тиаминдисульфид

Рис. 1. Масс-спектр продуктов окисления тиамин, полученный после инкубации растворов, содержащих смесь метмиоглобина, тиамин и пероксида водорода. Концентрации: метмиоглобин – 10 мкМ, тиамин – 5,0 мМ, пероксид водорода – 1,0 мМ

Fig. 1. Mass spectrum of thiamine oxidation products obtained after incubation of solutions containing a mixture of methmyoglobin, thiamine and hydrogen peroxide. The concentrations: methmyoglobin – 10 μM, thiamine – 5.0 mM, hydrogen peroxide – 1.0 mM

ния на хроматографе Agilent-1100, сорбент Zorbax-extend-C18. Масс-спектры тиамин и его производных регистрировали с использованием квадрупольно-времяпролетного tandemного масс-спектрометрического детектора Q-TOF 6550 в режиме ионизации электрораспылением (ESI). Концентрацию кислорода, образующегося при взаимодействии пероксида водорода с метмиоглобином, измеряли полярографическим методом, используя электрод Кларка (Hansatech Instruments Ltd). Концентрации димеров парацетамола, а также тиохрома и оксодигидротиохрома определяли на спектрофлуориметре CM2203 («Солар», Беларусь) [39].

Результаты и их обсуждение. После инкубации тиамин с метмиоглобином и пероксидом водорода наблюдалось расщепление молекулы тиамин по углероду метиленового мостика и образование в растворе производных пиримидинового и тиазолового компонентов в виде отдельных молекул, а в масс-спектре растворов тиамин после инкубации с метмиоглобином (рис. 1) – образование тиохрома ($m/z = 262,09$), оксодигидротиохрома ($m/z = 279,09$), тиамин-дисульфида, а также продуктов распада тиамин по метиленовому мостику – 2-метил-4-амино-5-гидроксиметилпиримидина ($m/z = 139,09$) и 4-метил-5- β -оксиэтилтиазола ($m/z = 143,00$). Образование молекулярного иона аминопиримидина ($m/z = 139,09$) или ($m/z = 141,95(M + 2H^+)$) наблюдалось только после инкубации тиамин с метмиоглобином и пероксидом водорода.

Аминопиримидиновый продукт разрушения тиамин (2-метил-4-амино-5-гидроксиметилпиримидин), полученный в пероксидазной реакции, катализируемой метмиоглобином, обладает флуоресценцией с максимумом при 330–335 нм. При комнатной температуре исходный тиамин не обладает регистрируемой флуоресценцией в водном растворе (рис. 2).

Хроматограмма водного раствора тиамин, полученная на «Аджилент-1100», представлена на рис. 3. После инкубации тиамин с метмиоглобином в присутствии пероксида водорода хроматограмма раствора смеси кроме пика тиамин ($R_t = 9,25$ мин) содержит также пики тиамин-тиазолона ($R_t = 7,883$ мин) и тиаминдисульфида ($R_t = 36,388$ мин), которым в масс-спектре соответствуют пики с $m/z = 265,11$, $m/z = 280,09$, $m/z = 563,22$.

Хроматограммы водных растворов тиамин после инкубации с метмиоглобином в присутствии пероксида водорода содержат пик с временем удерживания $R_t = 3,85$ мин, который принадлежит молекулам аминопиримидиновых компонентов, образовавшихся вследствие распада молекулы тиамин по метиленовому мостику. Эти продукты имеют спектр поглощения в ульт-

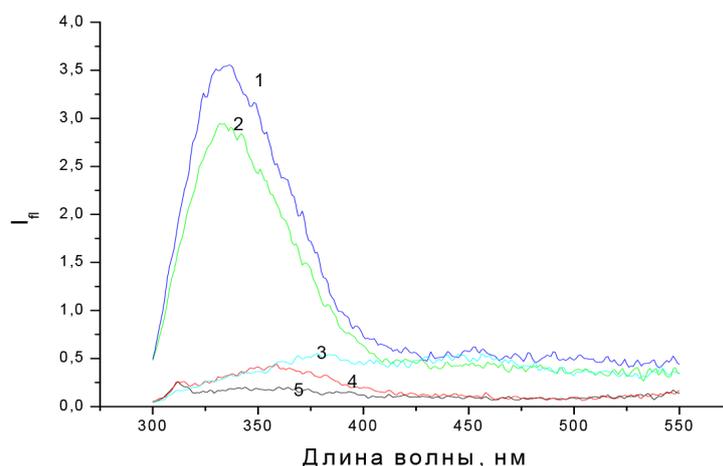


Рис. 2. Спектры флуоресценции продуктов окисления тиамин (Т) после его инкубации с метмиоглобином и пероксидом водорода: 1 – Mb(III) + Т + H₂O₂; 2 – Mb(III) + Т + H₂O₂; 3 – Т + H₂O₂; 4 – Mb(III) + Т + H₂O₂; 5 – Т (длина волны возбуждения – 280 нм; концентрации: Т – 0,05 мМ, пероксид водорода – 1 мМ, Mb(III) для проб 1, 3, 4 – 10 мкМ, для пробы 2 – 5 мкМ; значения pH: растворы проб № 1–3 и 5 – pH = 7,0 (0,05 М фосфатный буфер), раствор пробы № 4 – pH = 9,0)

Fig. 2. Fluorescence spectra of thiamine (T) oxidation products obtained after incubation of thiamine with methmyoglobin and hydrogen peroxide: 1 – Mb(III) + T + H₂O₂; 2 – Mb(III) + T + H₂O₂; 3 – T + H₂O₂; 4 – Mb(III) + T + H₂O₂; 5 – T (the length of the excitation wave – 280 nm; concentrations: T – 0.05 mM, hydrogen peroxide – 1 mM, Mb(III) – 10 μ M for samples N 1, 3, 4 and 5 μ M for sample 2; pH values: for solutions N 1–3 and N 5 – 7.0, for solution N 4 – 9.0)

трафиолетовой области спектра и регистрируются методом абсорбционной спектроскопии на длине волны, равной 280 нм. В масс-спектре им соответствует молекулярный ион с $m/z = 139,09$.

Тиазоловый компонент тиамина имеет полосу поглощения с максимумом при 250 нм, а при 280 нм не регистрируется. Следовательно, образование 2-метил-4-амино-5-амино-метилпиримидина (с $R_t = 3,88$ мин) можно использовать в качестве маркера разрушения тиамина по тиаминному пути при регистрации поглощения в области 250–300 нм (рис. 4).

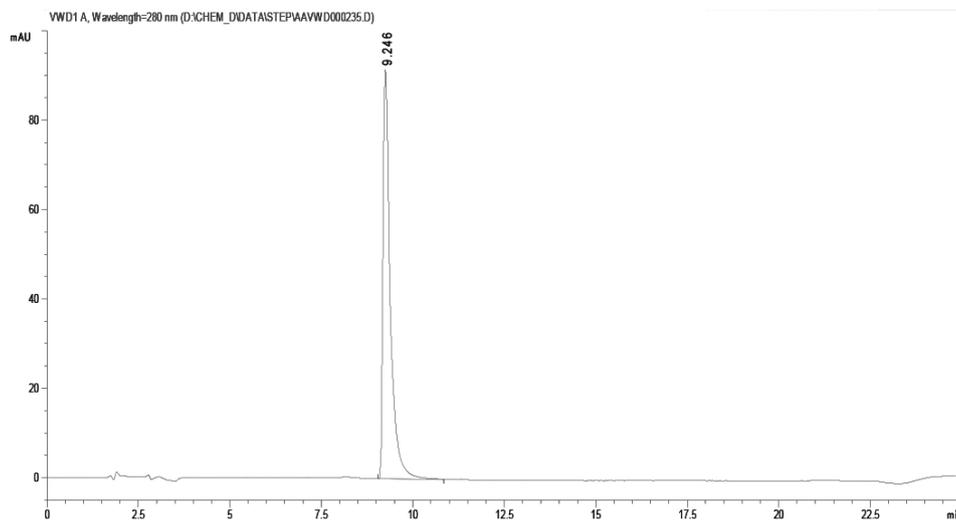


Рис. 3. Хроматограмма водного раствора тиамина, полученная на «Аджилент-1100» (пик тиамина – $R_t = 9,25$ мин; регистрация оптической плотности при длине волны 280 нм; концентрация тиамина – 0,1 мМ; фосфатный буфер, pH = 7,0)

Fig. 3. Chromatogram of aqueous thiamine solution obtained with an Agilent 1100 (the peak of thiamine – $R_t = 9.25$ min; optical density was recorded at a wavelength of 280 nm; the concentration of thiamine – 0.1 mM, phosphate buffer; pH = 7.0)

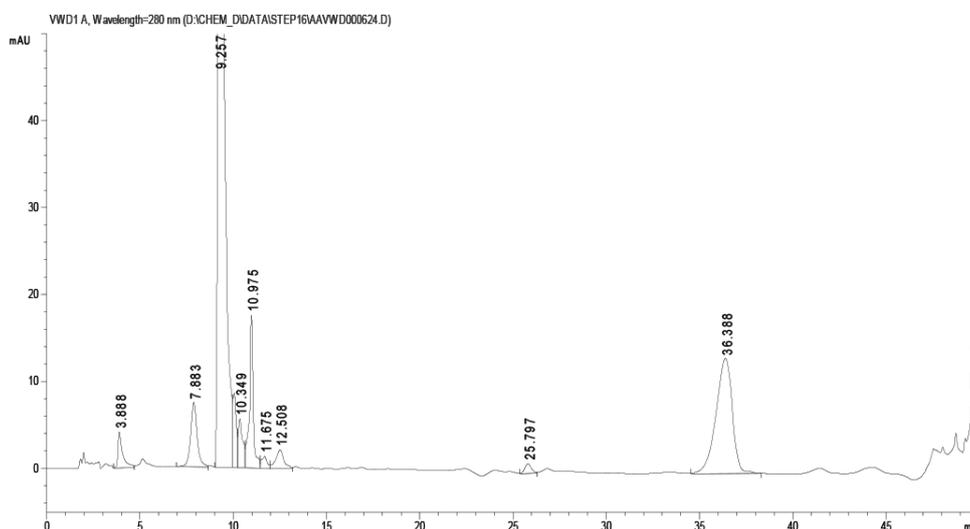


Рис. 4. Хроматограмма водных растворов тиамина (Т) в смеси с метмиоглобином и пероксидом водорода, полученная на «Аджилент-1100» (пики: 2-метил-4-амино-5-гидроксиметил пиримидин – $R_t = 3,88$ мин, тиаминтиазолон – $R_t = 7,88$ мин, Т – $R_t = 9,25$ мин, тиазолон – $R_t = 10,97$ мин, тиаминдисульфид – $R_t = 36,38$ мин; исходные концентрации: Т и пероксид водорода – 1,0 мМ, метмиоглобин – 10 мкМ; регистрация оптической плотности при длине волны 280 нм; время инкубации растворов – 20 ч)

Fig. 4. Chromatogram of aqueous thiamine solutions in a mixture with methmyoglobin and hydrogen peroxide obtained with an Agilent 1100 (the peaks: 2-methyl 4-amino 5-hydroxymethyl pyrimidine – $R_t = 3.88$ min, thiamine thiazolone – $R_t = 7.88$ min, T – $R_t = 9.25$ min, thiazolone – $R_t = 10.97$ min, thiamine disulfide – $R_t = 36.38$ min; T and hydrogen peroxide initial concentrations were 1.0 mM and that of methmyoglobin was 10 μ M; optical density was recorded at a wavelength of 280 nm; the incubation time of the solutions was 20 h)

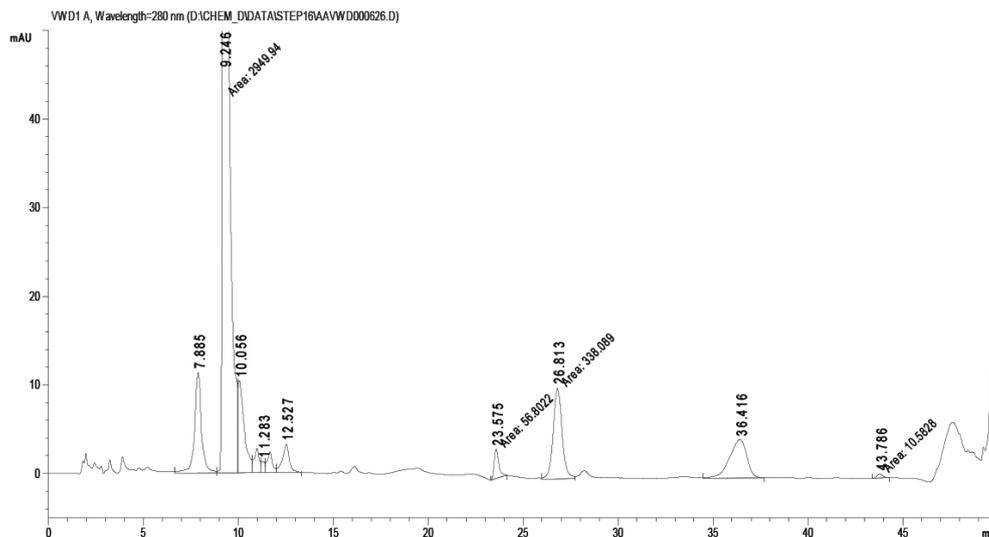


Рис. 5. Хроматограмма водных растворов тиамин (Т) в смеси с метмиоглобином, парацетамолом и пероксидом водорода, полученная на «Аджилент-1100» (пики: тиаминтиазолон – $R_t = 7,88$ мин, Т – $R_t = 9,25$ мин, тиохром – $R_t = 23,51$ мин, тиаминдисульфид – $R_t = 36,38$ мин; исходные концентрации: Т и пероксид водорода – 1,0 мМ, парацетамол – 0,1 мМ, метмиоглобин – 10 мкМ; время инкубации растворов – 20 ч; регистрация оптической плотности пиков выхода продуктов окисления тиамин при длине волны 280 нм)

Fig. 5. Chromatogram of aqueous thiamine solutions in a mixture with methmyoglobin, paracetamol and hydrogen peroxide obtained with an Agilent 1100 (the peaks: thiamine thiazolone – $R_t = 7.88$ min, T – $R_t = 9.25$ min, thiochrome – $R_t = 23.51$ min, thiamine disulfide – $R_t = 36.38$ min; initial concentrations: T and hydrogen peroxide – 1.0 mM, methmyoglobin – 10 μ M; the incubation time of the solutions was 20 h; optical density of peaks of thiamine oxidation products yield was recorded at a wavelength of 280 nm)

Пик со временем удерживания $R_t = 3,88$ мин на хроматограмме, полученной методом ВЭЖХ и представленной на рис. 4, в масс-спектре соответствует пику молекулярного иона с $m/z = 139,09$. В присутствии парацетамола ингибируется расщепление тиамин по углероду метиленового мостика. Пик со временем удерживания $R_t = 3,88$ мин уменьшается вплоть до полного исчезновения (рис. 5).

Результаты измерения продуктов окисления тиамин в пероксидазной реакции, катализируемой метмиоглобином в отсутствие и в присутствии парацетамола, приведены в табл. 1. Как видно из представленных данных, наряду с расщеплением тиамин по метиленовому мостику происходит окисление молекул тиамин с образованием тиаминдисульфида, оксодигидротиохрома, тиаминтиазолон.

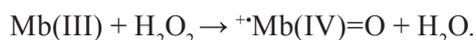
Т а б л и ц а 1. Выход продуктов окисления тиамин в пероксидазной реакции, катализируемой метмиоглобином, в отсутствие и в присутствии парацетамола

Table 1. Yield of thiamine oxidation products in methemoglobin-catalyzed reaction in the absence and presence of paracetamol

Состав инкубационной смеси	[TChr], мкМ, $R_t = 23$ мин	[ODTChr], мкМ, $R_t = 26$ мин	[T], мкМ, $R_t = 9,25$ мин	[TSST], мкМ, $R_t = 36,38$ мин	[TT], мкМ, $R_t = 7,88$ мин	[AP], мкМ, $R_t = 3,88$ мин
Mb(III) + T + H ₂ O ₂	0,8	25,0	270,6	240,0	30,0	186,0
Mb(III) + T + PAR + H ₂ O ₂	51,0	374,0	293,4	78,0	57,0	90,0

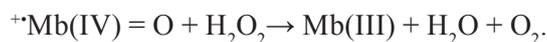
П р и м е ч а н и е. Т – тиамин, TChr – тиохром, ODTChr – оксодигидротиохром, TSST – тиаминдисульфид, TT – тиаминтиазолон, AP – 2-метил-4-амино 5-гидрокси метил пиримидин, PAR – парацетамол. Концентрации: тиамин и H₂O₂ – 1 мМ, парацетамол – 0,1 мМ, метмиоглобин – 10 мкМ. Время инкубации растворов – 20 ч, 0,05 М фосфатный буфер, pH = 7,0.

В реакции между ферри-миоглобином и пероксидом водорода в результате двухэлектронного окисления образуются ⁺Mb(IV=O) (соединение I) с радикалом, локализованным на порфириновом цикле, и молекула воды.



Один эквивалент окислителя расходуется на образование оксоферрильной формы гема Mb(IV=O), а другой – на образование порфиринового катиона π -радикала [9].

В отсутствие легкоокисляющихся субстратов, являющихся донорами электронов, происходит восстановление оксоферрильной формы миоглобина до ферри-формы под действием пероксида водорода:



Взаимодействие оксоферрильной формы миоглобина (соединение I) с пероксидом водорода в отсутствие легкоокисляющихся соединений сопровождается генерацией кислорода и образованием ферри-формы миоглобина. Эти результаты свидетельствуют о разрушении метмиоглобином пероксида водорода по каталазному пути. При высоких концентрациях парацетамола или тиаминина генерация метмиоглобином кислорода ингибируется вследствие разрушения пероксида водорода (табл. 2). Образование продуктов окисления парацетамола и тиаминина наряду с ингибированием генерации кислорода свидетельствует, во-первых, о протекании реакции по пероксидазному механизму, во-вторых, о конкуренции за места связывания молекул парацетамола и тиаминина с оксоферрильным комплексом гема.

Т а б л и ц а 2. Генерация кислорода при взаимодействии пероксида водорода с метмиоглобином в присутствии тиаминина (Т), тиаминдифосфата (ТРР) и парацетамола (РАР)

Table 2. Oxygen generation on interaction of hydrogen peroxide with methmyoglobin in the presence of thiamine (T), thiamine pyrophosphate (TPP) and paracetamol (PAR)

Состав раствора	[O ₂], нмоль/л
Mb(III) + H ₂ O ₂	148
Mb(III) + Т (0,1 мМ) + H ₂ O ₂	73
Mb(III) + Т (0,1 мМ) + РАР (0,1 мМ) + H ₂ O ₂	42
Mb(III) + ТРР (0,1 мМ) + H ₂ O ₂	108

П р и м е ч а н и е. Время инкубации водных растворов – 10 мин. Концентрация метмиоглобина – 10 мкМ, пероксида водорода – 1 мМ, Т, ТРР и РАР – 0,1 мМ.

Результаты измерения продуктов окисления тиаминина дифосфата в пероксидазной реакции, катализируемой метмиоглобином, в отсутствие и в присутствии парацетамола приведены в табл. 3.

Т а б л и ц а 3. Выход продуктов окисления тиаминдифосфата в пероксидазной реакции, катализируемой метмиоглобином в отсутствие и в присутствии парацетамола

Table 3. Yield of thiamine oxidation products in methemoglobin-catalyzed peroxidase reaction in the absence and presence of paracetamol

Состав	[ТРР], мкМ, Rt = 3,56 мин	[ТChrMP], мкМ, Rt = 12,22 мин	[ТChrPP], мкМ, Rt = 10,24 мин	[АР], мкМ, Rt = 3,96 мин	[Тz-PP], мкМ, Rt = 2,48 мин
ТРР + Mb + H ₂ O ₂	895,0	–	3,1	51,0	50,0
ТРР + Mb + РАР + H ₂ O ₂	690,0	51,0	200,0	3,0	3,0

П р и м е ч а н и е. ТРР – тиаминдифосфат, ТChrMP – тиохроммонофосфат, ТChrPP – тиохромдифосфат, АР – 2-метил-4-амино-5-гидроксиэтилпиримидин, Тz-PP – О-дифосфорный эфир 4-метил-5-β-оксиэтилтиазолий. Концентрация Т, ТМР, ТРР и H₂O₂, РАР – 1 мМ, Mb(III) – 10 мкМ. Время инкубации растворов – 20 ч, 0,05 М фосфатный буфер, pH = 7,0.

Тиаминдифосфат и тиаминмонофосфат, так же как и тиамин, ингибируют генерацию кислорода при инкубации с метмиоглобином и пероксидом водорода и расщепляются с образованием аминопиримидинового компонента и соответствующих моно- и дифосфатов тиазолового компонента.

Протекание этой реакции для молекул тиаминина схематически представлено на рис. 6.

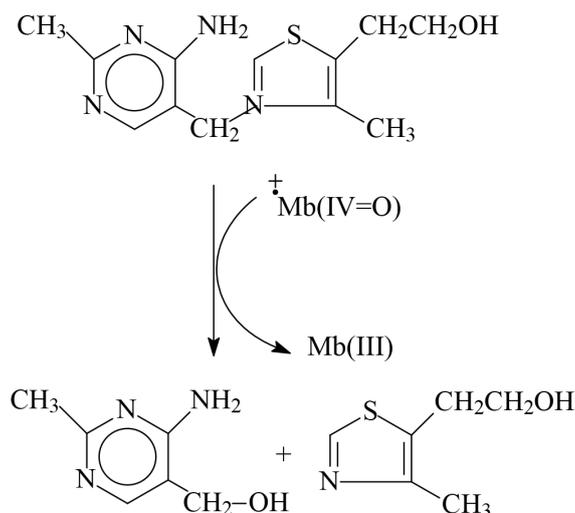


Рис. 6. Предполагаемая схема расщепления молекул тиамин по атому углерода метиленового мостика в реакции, катализируемой метмиоглобином и пероксидом водорода

Fig. 6. Tentative scheme of splitting of the methylene bridge in a thiamine molecule in the methmyoglobin-and hydrogen peroxide-catalyzed reaction

Как видно из данных, приведенных в табл. 3, оксоферрильные формы миоглобина катализируют расщепление и окислительную трансформацию фосфатов тиамин в основном по тиаминному пути. Тиохромфосфаты и фосфаты тиаминдисульфида, в отличие от тиамин, практически не образуются после инкубации фосфорных эфиров тиамин с метмиоглобином и пероксидом водорода. Тирозин и парацетамол ингибируют тиаминазную активность, но увеличивают выход тиохрома или фосфатов тиохрома. В табл. 3 приведены результаты измерения выхода продуктов окисления тиаминдифосфата в пероксидазной реакции, катализируемой метмиоглобином в отсутствие и в присутствии парацетамола.

Следует отметить факт образования тиохроммонофосфата после инкубации тиаминдифосфата с метмиоглобином и пероксидом водорода. Вероятно, в растворе происходит частично гидролиз тиаминдифосфата и затем последующее окисление образовавшегося тиаминдифосфата и тиаминмонофосфата в тиохроммонофосфат (табл. 3).

Цитозольный белок миоглобин содержится в высоких концентрациях в скелетных и сердечных мышцах. Концентрация миоглобина, например, в сердце составляет величину порядка 0,2–0,3 мМ. Как известно, миоглобин в кардиомиоцитах окисляется с образованием супероксиданионов и пероксида водорода [40, 41]. Схематически этот процесс аутоокисления оксимиоглобина можно представить следующими уравнениями:



Предполагается, что образовавшийся пероксид водорода может взаимодействовать с метмиоглобином с образованием оксоферрильных форм миоглобина [41].

Действительно, после смешивания метмиоглобина с пероксидом водорода наблюдается образование оксоферрильных форм миоглобина: $^+\text{Mb(IV=O)}$ (соединение I) и Mb(IV=O) (соединение II), которые легко регистрируются спектрофотометрически [16].

При нормальных физиологических условиях аутоокислительные реакции (1) и (2) очень медленны и протекают с низкой скоростью. Однако если кардиомиоциты функционируют в условиях ишемии (низкое значение рН, низкое давление кислорода в тканях), то резко возрастает образование активных форм кислорода и оксоферрильных форм миоглобина [42, 43], что может вызвать снижение коферментной формы тиамин при окислительном стрессе и нарушение энергетического метаболизма.

Анализ полученных результатов показал, что окислительная трансформация тиамин и фосфорных эфиров протекает различными путями. После инкубации тиамин с метмиоглобином и пероксидом водорода образуются циклические продукты, такие как тиохром и оксидигидро-тиохром, образуется тиаминдисульфид, а кроме того, происходит расщепление молекулы тиамин по метиленовому мостику. Методом ВЭЖХ среди продуктов трансформации тиамин обнаружен продукт, время удерживания которого ($R_t = 3,85$ мин) совпадает с временем удерживания 2-метил-4-амино-5-гидрокси-метил-пиримидина. Таким образом, данные масс-спектрологии, спектрально-флуоресцентные измерения (см. рис. 2), а также данные ВЭЖХ (см. табл. 1, рис. 4) свидетельствуют, вероятнее всего, об образовании 2-метил-4-амино-5-гидрокси-метил-пиримидина после инкубации тиамин с метмиоглобином и пероксидом водорода.

В случае инкубации монофосфата и дифосфата тиамин с оксоферрильными формами миоглобина образование тиохроммонофосфата и тиохромдифосфата затруднено. В смеси, содержащей тиаминдифосфат, пероксид водорода и метмиоглобин, образуются лишь небольшие количества тиохромдифосфата в сравнении с количеством тиохрома и оксидигидро-тиохрома, образовавшихся в растворах, содержащих тиамин. Эти результаты позволяют предположить, что вход в гемовый карман для молекул фосфорных эфиров тиамин затруднен по сравнению с молекулами тиамин.

Заключение. После инкубации тиамин с метмиоглобином и пероксидом водорода происходит расщепление молекулы тиамин по углероду метиленового мостика и в растворе образуются аминопиримидиновый и тиазоловый компоненты в виде отдельных молекул.

Тиаминмонофосфат и тиаминдифосфат после инкубации с метмиоглобином и пероксидом водорода также расщепляются с образованием аминопиримидинового компонента и соответствующих моно- и дифосфатов тиазолового компонента.

Тирозин и парацетамол ингибируют в обоих случаях тиаминазную активность, но увеличивают выход тиохрома или фосфатов тиохрома. Полученные результаты позволяют заключить, что тиамин и фосфорные эфиры тиамин расщепляются по метиленовому мостику под действием не только тиаминазы, но и метмиоглобина. Предполагается, что при разрушении тиаминдифосфата оксоферрильными формами миоглобина может наблюдаться недостаток тиамин в сердечной мышце при окислительном стрессе.

Список использованных источников

1. Inouye, K. Etiology and pathology of beriberi / K. Inouye, E. Katsura // Beriberi and Thiamine / ed. : N. Shimazono, E. Katsura. – Tokyo, 1965. – P. 1–28.
2. Tanphaichitr, V. Thiamine / V. Tanphaichitr // Handbook of Vitamins / ed. : R. B. Rucker [et al.]. – 3rd ed. – New York, 2001. – P. 275–316.
3. Lonsdale, D. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamine and its derivatives / D. Lonsdale // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2006. – Vol. 3, N 1. – P. 49–59.
4. Jordan, F. Current mechanistic understanding of thiamine diphosphate-dependent enzymatic reactions / F. Jordan // Natural Product Reports. – 2003. – Vol. 20, N 2. – P. 184–201.
5. Bâ, A. Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues / A. Bâ // Cellular and Molecular Neurobiology. – 2008. – Vol. 28, N 7. – P. 923–931.
6. Cooper, J. R. The role of thiamine in nervous tissue / J. R. Cooper, J. H. Pincus // Neurochemical Research. – 1979. – Vol. 4, N 2. – P. 223–239.
7. Itokawa, Y. Thiamine in nerve membranes / Y. Itokawa, R. A. Schulz, J. R. Cooper // Biochimica et Biophysica Acta (BBA). – Biomembranes. – 1972. – Vol. 266, N 1. – P. 293–299.
8. Matsuda, T. Thiamine as an integral component of brain synaptosomal membranes / T. Matsuda, J. R. Cooper // Proc. of the Nat. Acad. of Sciences. – 1981. – Vol. 78, N 9. – P. 5886–5889.
9. Thiamine and Alzheimer's disease. A pilot study / J. P. Blass [et al.] // Archives of Neurology. – 1988. – Vol. 45, N 8. – P. 833–835.
10. Brown, L. A. Chronic ethanol ingestion potentiates TNF-alpha-mediated oxidative stress and apoptosis in rat type II cells / L. A. Brown, F. L. Harris, D. M. Guidot // Amer. J. of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. – 2001. – Vol. 281, N 2. – P. 377–386.
11. Benfotiamine exhibits direct antioxidative capacity and prevents induction of DNA damage *in vitro* / U. Schmid [et al.] // Diabetes/Metabolism Research and Rev. – 2008. – Vol. 24, N 5. – P. 371–377.
12. Changes in nitric oxide synthase-containing neurons in the brain of thiamine-deficient mice / H. Matsushita [et al.] // Acta Histochemica et Cytochemica. – 2000. – Vol. 33, N 2. – P. 67–72.

13. Calingasan, N. Y. Vascular endothelium is a site of free radical production and inflammation in areas of neuronal loss in thiamine-deficient brain / N. Y. Calingasan, G. E. Gibson // *Annals of the New York Acad. of Sciences*. – 2000. – Vol. 903, N 1. – P. 353–356.
14. Gibson, G. E. Thiamine-dependent processes and treatment strategies in neurodegeneration / G. E. Gibson, J. P. Blass // *Antioxidants and Redox Signaling*. – 2007. – Vol. 9, N 10. – P. 1605–1619.
15. Gibson, G. E. Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration / G. E. Gibson, H. Zhang // *Neurochemistry Intern.* – 2002. – Vol. 40, N 6. – P. 493–504.
16. 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 Acad. Publ., 2014. – 280 p.
17. Van Dort, H. M. Identification and synthesis of new odor compounds from photolysis of thiamine / H. M. Van Dort, L. M. Van der Linde, D. de Rijke // *J. of Agricultural and Food Chemistry*. – 1984. – Vol. 32, N 3. – P. 454–457.
18. Березовский, В. М. Химия витаминов / В. М. Березовский. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Пищевая пром-сть, 1973. – 632 с.
19. Potent radical-scavenging activities of thiamin and thiamin diphosphate / Y. Okai [et al.] // *J. of Clinical Biochemistry and Nutrition*. – 2007. – Vol. 40, N 1. – P. 42–48.
20. Stepuro, I. I. Thiamine and vasculopathies / I. I. Stepuro // *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. – 2005. – Vol. 72, N 2. – P. 115–127.
21. Reddi, K. K. Purification and separation of the two thiaminases in fresh water mussel (*Lamellidens marginalis*) / K. K. Reddi, K. V. Giri // *Enzymologia*. – 1948/1949. – Vol. 13. – P. 281.
22. Островский, Ю. М. Тиамин : избр. главы по биохимии витамина В1 / Ю. М. Островский. – Минск : Беларусь, 1971. – 142 с.
23. Fujita, A. The second type of bacterial thiaminase / A. Fujita, Y. Nose, K. Kuratani // *J. of Vitaminology*. – 1954. – Vol. 1, N 1. – P. 1–7.
24. Somogyi, J. C. Connection between chemical structure and antithiamine activity of various phenol derivatives / J. C. Somogyi, R. Bönicke // *Intern. Ztschr. für Vitaminforschung*. – 1969. – Vol. 39, N 1. – P. 65–73.
25. Somogyi, J. On antithiamine factors of fern / J. Somogyi // *J. of Vitaminology*. – 1971. – Vol. 17, N 3. – P. 165–174.
26. Beriberi caused by antithiamin factors in food and its prevention / S. Vimokesant [et al.] // *Annals of the New York Acad. of Sciences*. – 1982. – Vol. 378, N 1. – P. 123–136.
27. Chemical interactions between thiamin and tannic acid. I. Kinetics, oxygen dependence and inhibition by ascorbic acid / K. Rungruangsak [et al.] // *Amer. J. of Clinical Nutrition*. – 1977. – Vol. 30, N 10. – P. 1680–1685.
28. Singleton, C. K. Molecular mechanisms of thiamine utilization / C. K. Singleton, P. R. Martin // *Current Molecular Medicine*. – 2001. – Vol. 1, N 2. – P. 197–207.
29. Ariaey-Nejad, M. R. 4-Methylthiazole-5-acetic acid – a urinary metabolite of thiamine / M. R. Ariaey-Nejad, W. N. Pearson // *J. of Nutrition*. – 1968. – Vol. 96, N 4. – P. 445–449.
30. Основы биохимии / А. Уайт [и др.]; пер. с англ. Л. М. Гинодмана. – М. : Мир, 1981. – Т. 3. – С. 1155–1878.
31. Everse, J. Peroxidative activities of hemoglobin and hemoglobin derivatives / J. Everse, M. C. Johnson, M. A. Marini // *Methods in Enzymology*. – 1994. – Vol. 231. – P. 547–561.
32. Everse, J. The toxicities of native and modified hemoglobins / J. Everse, N. Hsia // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1997. – Vol. 22, N 6. – P. 1075–1099.
33. Herold, S. Kinetic and mechanistic studies of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl myoglobin / S. Herold, F.-J. K. Rehman // *J. of Biol. Inorganic Chemistry*. – 2001. – Vol. 6, N 5–6. – P. 543–555.
34. Evidence for the role of a peroxidase compound I-type intermediate in the oxidation of glutathione, NADH, ascorbate, and dichlorofluorescein by cytochrome c/H₂O₂ / A. Lawrence [et al.] // *J. Biol. Chemistry*. – 2003. – Vol. 278, N 32. – P. 29410–29419.
35. 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.
36. Exner, M. Kinetic and mechanistic studies of the peroxynitrite – mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin / M. Exner, S. Herold // *Chem. Research in Toxicology*. – 2000. – Vol. 13, N 4. – P. 287–293.
37. Giulivi, C. [30] Hydrogen peroxide mediated ferrilhemoglobin generation *in vitro* and in red blood cells / C. Giulivi, K. J. A. Davies // *Methods in Enzymology*. – 1994. – Vol. 231. – P. 490–496.
38. The globin-based free radical of ferryl hemoglobin is detected in normal human blood / D. A. Svistunenko [et al.] // *J. of Biol. Chemistry*. – 1997. – Vol. 272, N 11. – P. 7114–7121.
39. Оксоферильные формы миоглобина и гемоглобина в присутствии фенолсодержащих соединений катализируют окислительную трансформацию тиамина и его производных / С. А. Лабор [и др.] // *Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук*. – 2017. – № 2. – С. 55–65.
40. Shikama, K. Autoxidation of oxymyoglobin: A meeting point of the stabilization and the activation of molecular oxygen / K. Shikama // *Biological Reviews*. – 1990. – Vol. 65, N 4. – P. 517–527.
41. Yusa, K. Oxidation of oxymyoglobin to metmyoglobin with hydrogen peroxide: Involvement of ferrylintermediate / K. Yusa, K. Shikama // *Biochemistry*. – 1987. – Vol. 26, N 21. – P. 6684–6688.
42. Mechanism of autooxidation for hemoglobins and myoglobins. Promotion of superoxide production by protons and anions / W. J. Wallace [et al.] // *J. of Biol. Chemistry*. – 1982. – Vol. 257, N 9. – P. 4966–4977.
43. Gunther, M. R. Potential roles of myoglobin autoxidation in myocardial ischemia-reperfusion injury / M. R. Gunther, V. Sampath, W. S. Caughey // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1999. – Vol. 26, N 11–12. – P. 1388–1395.

References

1. Inouye K., Katsura E. Etiology and pathology of beriberi. *Beriberi and Thiamine*. Tokyo, 1965, pp. 1–28.
2. Tanphaichitr V. Thiamine. *Handbook of Vitamins*. 3rd ed. New York, 2001, pp. 275–316.
3. Lonsdale D. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2006, vol. 3, no. 1, pp. 49–59. DOI: 10.1093/ecam/nek009
4. Jordan F. Current mechanistic understanding of thiamin diphosphate-dependent enzymatic reactions. *Natural Product Reports*, 2003, vol. 20, no. 2, pp. 184–201. DOI: 10.1039/b111348h
5. Bâ A. Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2008, vol. 28, no. 7, pp. 923–931. DOI: 10.1007/s10571-008-9297-7
6. Cooper J. R., Pincus J. H. The role of thiamine in nervous tissue. *Neurochemical Research*, 1979, vol. 4, no. 2, pp. 223–239. DOI: 10.1007/bf00964146
7. Itokawa Y., Schulz R. A., Cooper J. R. Thiamine in nerve membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1972, vol. 266, no. 1, pp. 293–299. DOI: 10.1016/0005-2736(72)90144-7
8. Matsuda T., Cooper J. R. Thiamine as an integral component of brain synaptosomal membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1981, vol. 78, no. 9, pp. 5886–5889. DOI: 10.1073/pnas.78.9.5886
9. Blass J. P., Gleason P., Brush D., DiPonte P., Thaler H. Thiamine and Alzheimer's disease. A pilot study. *Archives of Neurology*, 1988, vol. 45, no. 8, pp. 833–835. DOI: 10.1001/archneur.1988.00520320019008
10. Brown L. A., Harris F. L., Guidot D. M. Chronic ethanol ingestion potentiates TNF-alpha-mediated oxidative stress and apoptosis in rat type II cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2001, vol. 281, no. 2, pp. 377–386. DOI: 10.1152/ajplung.2001.281.2.1377
11. Schmid U., Stopper H., Heidland A., Schupp N. Benfotiamine exhibits direct antioxidative capacity and prevents induction of DNA damage *in vitro*. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 2008, vol. 24, no. 5, pp. 371–377. DOI: 10.1002/dmrr.860
12. Matsushita H., Takeuchi Y., Kosaka K., Fushiki Sh., Kawata M., Sawada T. Changes in nitric oxide synthase-containing neurons in the brain of thiamine-deficient mice. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 2000, vol. 33, no. 2, pp. 67–72. DOI: 10.1267/ahc.33.67
13. Calingasan N. Y., Gibson G. E. Vascular endothelium is a site of free radical production and inflammation in areas of neuronal loss in thiamine-deficient brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000, vol. 903, pp. 353–356. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06386.x
14. Gibson G. E., Blass J. P. Thiamine-dependent processes and treatment strategies in neurodegeneration. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2007, vol. 9, no. 10, pp. 1605–1619. DOI: 10.1089/ars.2007.1766
15. Gibson G. E., Zhang H. Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration. *Neurochemistry International*, 2002, vol. 40, no. 6, pp. 493–504. DOI: 10.1016/s0197-0186(01)00120-6
16. 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*. S. l., LAP LAMBERT Academic Publishing, 2014. 280 p.
17. Van Dort H. M., Van der Linde L. M., de Rijke D. Identification and synthesis of new odor compounds from photolysis of thiamine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1984, vol. 32, no. 3, pp. 454–457. DOI: 10.1021/jf00123a007
18. Berezovskii V. M. *Chemistry of Vitamins*. 2nd ed. Moscow, Pishchevaya promyshlennost' Publ., 1973. 632 p. (in Russian).
19. Okai Y., Higashi-Okai K., Sato E. F., Konaka R., Inoue M. Potent radical-scavenging activities of thiamin and thiamin diphosphate. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2007, vol. 40, no. 1, pp. 42–48. DOI: 10.3164/jcfn.40.42
20. Stepuro I. I. Thiamine and vasculopathies. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2005, vol. 72, no. 2, pp. 115–127. DOI: 10.1016/j.plefa.2004.10.009
21. Reddi K. K., Giri K.V. Purification and separation of the two thiaminases in fresh water mussel (*Lamellidens marginalis*). *Enzymologia*, 1948/1949, vol. 13, p. 281.
22. Ostrovskii Yu. M. *Thiamine: Selected chapters on the biochemistry of vitamin B1*. Minsk, Belarus' Publ., 1971. 142 p. (in Russian).
23. Fujita A., Nose Y., Kuratani K. The second type of bacterial thiaminase. *Journal of Vitaminology*, 1954, vol. 1, no. 1, pp. 1–7. DOI: 10.5925/jnsv1954.1.1
24. Somogyi J. C., Bönicker R. Connection between chemical structure and antithiamine activity of various phenol derivatives. *Internationale Zeitschrift für Vitaminforschung*, 1969, vol. 39, no. 1, pp. 65–73.
25. Somogyi J. On antithiamine factors of fern. *Journal of Vitaminology*, 1971, vol. 17, no. 3, pp. 165–174. DOI: 10.5925/jnsv1954.17.165
26. Vimokesant S., Kunjara S., Rungruangsak K., Nakornchai S., Panijpan B. Beriberi caused by antithiamin factors in food and its prevention. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1982, vol. 378, no. 1, pp. 123–136. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1982.tb31191.x
27. Rungruangsak K., Tosukh Wong P., Panijpan B., Vimokesant S. L. Chemical interactions between thiamin and tannic acid. I. Kinetics, oxygen dependence and inhibition by ascorbic acid. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1977, vol. 30, no. 10, pp. 1680–1685. DOI: 10.1093/ajcn/30.10.1680
28. Singleton C. K., Martin P. R. Molecular mechanisms of thiamine utilization, *Current Molecular Medicine*, 2001, vol. 1, no. 2, pp. 197–207. DOI: 10.2174/1566524013363870
29. Ariaey-Nejad M. R., Pearson W. N. 4-Methylthiazole-5-acetic acid – a urinary metabolite of thiamine. *Journal of Nutrition*, 1968, vol. 96, no. 4, pp. 445–449. DOI: 10.1093/jn/96.4.445

30. White A., Hendler F., Smith E., Hill P., Leman I. *Principles of Biochemistry*. 6th ed. New York, McGraw-Hill, 1978. 1492 p. (Russ. ed. : Uait A., Khendler F., Smit E., Khill R., Leman I. *Principles of Biochemistry*. Moscow, Mir Publ., 1981, vol. 3, pp. 1155–1878).
31. Everse J., Johnson M. C., Marini C. Peroxidative activities of hemoglobin and hemoglobin derivatives. *Methods in Enzymology*, 1994, vol. 231, pp. 547–561. DOI: 10.1016/0076-6879(94)31038-6
32. Everse J., Hsia N. The toxicities of native and modified hemoglobins. *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, vol. 22, no. 6, pp. 1075–1099. DOI: 10.1016/s0891-5849(96)00499-6
33. Herold S., Rehman F.-J. K. Kinetic and mechanistic studies of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl myoglobin. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2001, vol. 6, no. 5–6, pp. 543–555. DOI: 10.1007/s007750100231
34. Lawrence A., Jones C. M., Wardman P., Burkitt M. J. Evidence for the role of a peroxidase compound I-type intermediate in the oxidation of glutathione, NADH, ascorbate, and dichlorofluorescein by cytochrome c/H₂O₂. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, vol. 278, no. 32, pp. 29410–29419. DOI: 10.1074/jbc.m300054200
35. Stepuro I. I., Oparin A. Yu., Stsiapura V. I., Maskevich S. A., Titov V. Yu. 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. DOI: 10.1134/s0006297912010051
36. 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. DOI: 10.1021/tx990201k
37. Giulivi C., Davies K. J. A. [30] Hydrogen peroxide mediated ferrilhemoglobin generation *in vitro* and in red blood cells. *Methods in Enzymology*, 1994, vol. 231, pp. 490–496. DOI: 10.1016/0076-6879(94)31032-7
38. 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. DOI: 10.1074/jbc.272.11.7114
39. Labor S. A., Stepuro 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 Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 2, pp. 55–65 (in Russian).
40. Shikama K. Autoxidation of oxymyoglobin: A meeting point of the stabilization and the activation of molecular oxygen. *Biological Reviews*, 1990, vol. 65, no. 4, pp. 517–527. DOI: 10.1111/j.1469-185X.1990.tb01236.x
41. Yusa K., Shikama K. Oxidation of oxymyoglobin to metmyoglobin with hydrogen peroxide: Involvement of ferryl intermediate. *Biochemistry*, 1987, vol. 26, no. 21, pp. 6684–6688. DOI: 10.1021/bi00395a018
42. Wallace W. J., Houtchens R. A., Maxwell J. C., Caughey W. S. Mechanism of autooxidation for hemoglobins and myoglobins. Promotion of superoxide production by protons and anions. *Journal of Biological Chemistry*, 1982, vol. 257, no. 9, pp. 4966–4977.
43. Gunther M. R., Sampath V., Caughey W. S. Potential roles of myoglobin autoxidation in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, vol. 26, no. 11–12, pp. 1388–1395. DOI: 10.1016/s0891-5849(98)00338-4

Информация об авторах

Stepuro Ivan Ivanovich – 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.

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

Shuryberka Aleksey Vladimirovich – аспирант, мл. науч. сотрудник. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (БЛК, 50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: the_chemistry@tut.by.

Stepuro Vitaliy Ivanovich – 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.

Smirnov Vitaliy Yuryevich – ст. науч. сотрудник, доцент. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: vit_sm@mail.ru.

Yantsevich Aleksey Viktorovich – канд. хим. наук, заведующий лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь).

Information about the authors

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

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

Aliaksei V. Shuryberka – Postgraduate student, Junior researcher. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (50, BLK, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: the_chemistry@tut.by.

Vitaliy I. Stsiapura – 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.

Vitaliy Y. Smirnov – Senior Researcher, Assistant Professor. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: vit_sm@mail.ru.

Yantsevich Aleksey V. – Ph. D. (Chem.), Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus).