

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 577.164.1
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-2-199-211>

Поступила в редакцию 20.07.2019
Received 20.07.2019

И. И. Степура¹, С. А. Лабор¹, В. И. Степура², А. В. Янцевич³

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

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

³Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЕ РИБОФЛАВИНОМ ОКИСЛЕНИЕ ТИАМИНА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ УЛЬТРАФИОЛЕТА И ВИДИМОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Аннотация. При воздействии ультрафиолета UVA ($\lambda = 315\text{--}400$ нм) и видимого света ($\lambda > 400$ нм) на водные растворы тиамин в смеси с рибофлавином тиамин окисляется в тиохром и оксодигидротиохром. Окисление тиамин в тиохром в аэробных условиях происходит с участием синглетного кислорода. В анаэробных условиях при воздействии ультрафиолета и видимого излучения на водные растворы тиамин последний в присутствии рибофлавина не окисляется. Тиохром в аэробных условиях под действием как синглетного кислорода, так и фотосенсибилизатора (рибофлавина в триплетном состоянии) окисляется с образованием оксодигидротиохрома. В анаэробных условиях окисление тиохрома с образованием оксодигидротиохрома происходит с участием фотосенсибилизатора рибофлавина в триплетном состоянии.

В работе обсуждаются возможные механизмы повреждения клеточных структур глаза вследствие инактивации тиамин-зависимых ферментов под действием интенсивного видимого света в присутствии эндогенного фотосенсибилизатора – рибофлавина.

Ключевые слова: тиамин, рибофлавин, тиохром, оксодигидротиохром, ультрафиолет UVA, видимый свет

Для цитирования: Фотосенсибилизированное рибофлавином окисление тиамин в водных растворах при воздействии ультрафиолета и видимого излучения / И. И. Степура [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 2. – С. 199–211. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-2-199-211>

Ivan I. Stepuro¹, Svetlana A. Labor¹, Vitali I. Stsiapura², Aleksey V. Yantsevich³

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

³Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

RIBOFLAVIN-PHOTOSENSITIZED THIAMINE OXIDATION IN AQUEOUS SOLUTIONS ON EXPOSURE TO ULTRAVIOLET AND VISIBLE LIGHT

Abstract. It was shown the irradiation of aqueous solutions of thiamine and riboflavin with ultraviolet UVA (315–400 nm) and visible light ($\lambda > 400$ nm) leads to oxidation of thiamine to thiochrome and oxodihydrothiochrome. In absence of riboflavin in aerobic conditions thiamine oxidation to thiochrome was mainly due to reaction with singlet oxygen. Under anaerobic conditions, thiamine in the presence of riboflavin was photostable and UV and visible light irradiation of their aqueous solutions did not result in thiamine oxidation. Under aerobic conditions, thiochrome was oxidized to form oxodihydrothiochrome in reactions with singlet oxygen and riboflavin in triplet states. Under anaerobic conditions, oxidation of thiochrome to oxodihydrothiochrome occurred due to reaction with riboflavin in triplet state. Possible mechanisms of the damage of cellular eye structures due to inactivation of thiamine-dependent enzymes on exposure to intensive UVA and visible light in the presence of endogenous photosensitizer riboflavin are discussed.

Keywords: thiamin, riboflavin, thiochrome, oxodihydrothiochrome, ultraviolet UVA, visible light

For citation: Stepuro I. I., Labor S. A., Stsiapura V. I., Yantsevich A. V. Riboflavin-photosensitized thiamine oxidation in aqueous solutions on exposure to ultraviolet and visible light. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 2, pp. 199–211 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-2-199-211>

Введение. Ионизирующее и ультрафиолетовое излучение вызывает повреждение и гибель клеток вследствие как прямого воздействия на структуру ДНК и белков, так и вследствие генерации активных форм кислорода и активных карбонильных соединений. Белки составляют до 70 % от сухого веса клеток и тканей, поэтому во многих случаях служат важной мишенью при воздействии ультрафиолета или ионизирующего излучения. Из всех хромофорных групп

(исключая простетические), входящих в состав белков, наиболее высоким поглощением в ближнем УФ-диапазоне обладают индольное кольцо триптофана, а также тирозильные остатки.

Прямое воздействие ультрафиолета осуществляется путем поглощения излучения белками или связанными с ними хромофорными группами, вызывая возбужденные состояния (синглетные или триплетные) либо образование свободных радикалов вследствие фотоионизации [1].

Другие важнейшие процессы, приводящие к окислению белков, связаны с генерацией синглетного кислорода благодаря переносу энергии с возбужденных ароматических аминокислотных остатков белка, в первую очередь остатков тирозина и триптофана, на молекулы кислорода в основном в триплетном состоянии [2, 3]. В результате этой реакции образуется синглетный кислород ($^1\text{O}_2$).

Тиамин (или витамин B_1), являясь незаменимым элементом питания для организма, используется как структурный компонент молекулы тиаминдифосфата, который является кофактором таких важнейших ферментов энергетического метаболизма, как пируватдегидрогеназа и α -кетоглутаратдегидрогеназа, а также кофактором транскетолазы – ключевого фермента пентозофосфатного цикла. Тиамин не является классическим витамином-антиоксидантом, однако его дефицит на фоне окислительного стресса вызывает нейродегенеративные заболевания [4], гибель нейронов [5], развитие дегенеративных процессов в фибриллах клеток хрусталика [6]. При воздействии ультрафиолета на водные растворы тирозина, триптофана или водные растворы белков генерируются синглетный кислород, феноксильные и триптофанильные свободные радикалы аминокислот или свободные радикалы соответствующих аминокислотных остатков белков, которые окисляют тиамин и фосфорные эфиры тиамин [7]. Тиамин не поглощает электромагнитное излучение с $\lambda > 300$ нм и устойчив к действию ультрафиолета UVA ($\lambda = 315\text{--}400$ нм) и видимого света. Однако в организме присутствует целый ряд хромофоров и простетических групп ферментов, способных генерировать синглетный кислород под действием видимого света. Это рибофлавин, витамин B_6 , белки, содержащие ковалентно связанные фосфопиридоксильные остатки с первичными аминогруппами (ϵ -аминогруппами остатков лизина, α -аминогруппами N-конца полипептидной цепи белковой макромолекулы) [8].

Ранее показано, что тиамин эффективно окисляется синглетным кислородом, который генерируется рибофлавином под действием видимого света [9].

Цель данной работы – исследование фотосенсибилизированного рибофлавином окисления тиамин при воздействии ультрафиолета или видимого света на водные растворы тиамин, идентификация молекул – продуктов окисления витамина B_1 и определение их строения.

Материалы и методы исследования. В работе использовали тиамин, тиохром и рибофлавин фирмы Sigma (США). Оксидигидротиохром получали по ранее описанному методу [10].

Растворенный в воде кислород удаляли с помощью сульфита натрия. Концентрацию растворенного кислорода определяли с помощью электрода Кларка (Hansatech Instruments Ltd).

Масс-спектрометрический анализ водных растворов производных тиамин проводили, используя хроматографическую систему Agilent Infinity 1290 с разделением на колонке C18 Hypersil gold 100 \times 2,1 (ThermoSci). Масс-спектрометрическое детектирование осуществляли с помощью квадрупольно-времяпролетного tandemного масс-спектрометрического детектора Q-TOF 6550 (Agilent) в режиме ионизации электрораспылением (ESI). Для обработки хроматограмм и масс-спектров использовали программу Mass Hunter Qualitative Analysis (Agilent), для определения концентраций тиохрома и оксидигидротиохрома – спектрофлуориметр CM2203 («Солар», Беларусь) [10, 11]. Концентрацию тиохрома в смеси с другими соединениями оценивали в растворах с оптической плотностью при длине волны возбуждающего света, не превышающей 0,2. Определение концентраций тиохрома и оксидигидротиохрома флуоресцентным методом проводили в присутствии рибофлавина после предварительного разбавления его растворов до концентрации ≤ 5 мкМ. Эффект внутреннего фильтра на интенсивность флуоресценции вследствие присутствия рибофлавина не учитывали. Растворы тиамин, а также растворы тиамин в смеси с рибофлавином облучали ртутной лампой СВД-120А. Для выделения областей спектра излучения в ультрафиолетовом (UVA, $\lambda = 315\text{--}400$ нм) и видимом ($\lambda \geq 400$ нм) диапазонах использовали светофильтры.

Для выделения линий излучения ртути при 365 и 436 нм применяли светофильтры УФС-6 и СЗС-22 соответственно, а для выделения спектральной области 320–500 нм – светофильтр СС2. Облучение светом с $\lambda > 300$ нм производили в стеклянной кювете, в остальных случаях – в кварцевой. Растворы тиамин в смеси с рибофлавином в процессе эксперимента хранили в светонепроницаемой коробке для исключения облучения образцов рассеянным солнечным светом. Спектры поглощения определяли на спектрофотометре Cary-100 (США).

Результаты исследования. Фотосенсибилизированное рибофлавином окисление тиамин в водных растворах при воздействии ультрафиолета UVA и видимого излучения в аэробных условиях. В тиамине пиримидиновый и тиазоловый компоненты соединены между собой метиленовым мостиком, но π -сопряженные системы компонентов фактически изолированы друг от друга. Кроме того, сами плоскости ароматических циклов, по данным рентгеноструктурного анализа, расположены в кристаллах под углом примерно 90° [12] и, вероятно, эффект сопряжения их электронных систем в растворе также незначителен. Поэтому можно предположить, что тиазоловый и пиримидиновый компоненты будут окисляться активными формами кислорода и свободными радикалами независимо.

При отсутствии в растворе фотосенсибилизатора тиамин и его фосфорные эфиры устойчивы к воздействию видимого света. Облучение видимым светом, а также ультрафиолетом UVA ($\lambda = 315\text{--}400$ нм) в течение 0,5–1 ч водных растворов тиамин не приводило к изменению его содержания в растворе и образованию продуктов фотолиза. Это связано с тем, что тиамин не поглощает свет с длинами волн больше 300 нм и поэтому устойчив к действию видимого света.

Спектр поглощения тиамин содержит две полосы поглощения с максимумами 233 и 267 нм (рис. 1, кривая 1). Только в присутствии рибофлавина наблюдали окисление тиамин в водных растворах под действием видимого света. Форма спектра поглощения смеси тиамин с рибофлавином изменяется при 200–300 и 300–400 нм (рис. 2). Наблюдается возрастание поглощения при 340–350 нм, характерное для оксодигидротиохрома (см. рис. 1, кривая 2).

Среди продуктов окисления тиамин обнаружены тиохром и оксидигидротиохром, флуоресценция которых достигает максимума при 450 и 440 нм соответственно [10]. На рис. 1 представ-

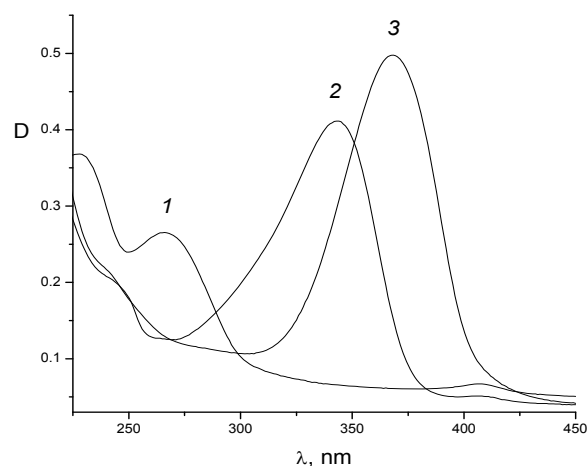


Рис. 1. Спектры поглощения тиамин (1), оксидигидротиохрома (2), тиохрома (3). Концентрация соединений – 0,25 мМ, 0,05 мМ фосфатный буфер, рН = 7,0. Спектры поглощения регистрировали в 10 мм кварцевой кювете

Fig. 1 Absorption spectra of thiamine (1), oxodihydrothiochrome (2) and thiochrome (3). The concentration of the compounds was 0.25 mM in 0.05 mM phosphate buffer, pH 7.0. Absorption spectra were measured in 10 mm quartz cell

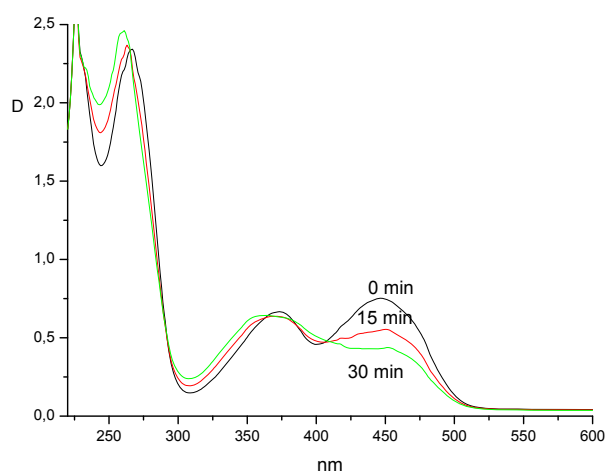


Рис. 2. Спектры поглощения водных растворов тиамин в смеси с рибофлавином в зависимости от времени облучения видимым светом. Растворы облучали в стеклянной кювете. Спектры поглощения после облучения регистрировали в 10 мм кварцевой кювете. Концентрация тиамин и рибофлавина – 0,1 мМ, 0,05 мМ фосфатный буфер, рН = 7,0

Fig. 2. Absorption spectra of aqueous solutions of thiamine in mixture with riboflavin at different times of the solutions irradiation by visible light. The solutions were irradiated in a glass cell. Absorption spectra were measured in 10 mm quartz cell. Thiamine and riboflavin concentrations were 0.1 mM and 0.05 mM, respectively, in phosphate buffer, pH 7.0

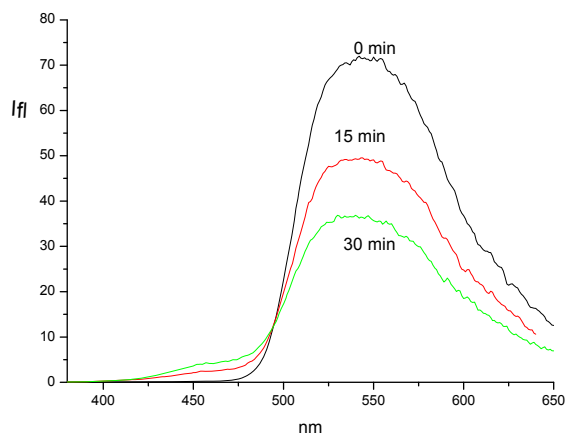


Рис. 3. Спектры флуоресценции водных растворов тиамин в смеси с рибофлавином в зависимости от времени облучения растворов видимым светом. Растворы облучали в стеклянной кювете. Концентрация тиамин и рибофлавин – 0,1 мМ, 0,05 мМ фосфатный буфер, pH = 7,0. Длина волны возбуждения флуоресценции 360 нм

Fig. 3. Fluorescence spectra of aqueous solutions of thiamine in mixture with riboflavin depending on the time of solution irradiation by visible light. The solutions were irradiated in a glass cell. The thiamine and riboflavin concentration was 0.1 mM, 0.05 mM phosphate buffer, pH 7.0. Excitation wavelength of the fluorescence – 360 nm

лены спектры поглощения тиамин, тioxрома и оксодигидротioxрома в изомолярных концентрациях. При возбуждении длиной волны 360 нм флуоресцирует главным образом тioxром, а при возбуждении длиной волны 340 нм – оксодигидротioxром. На рис. 3 представлены спектры флуоресценции водного раствора тиамин в смеси с рибофлавином в зависимости от времени облучения растворов видимым светом. Флуоресценцию облученных растворов возбуждали при длине волны 360 нм.

Кроме флуоресценции тioxрома и оксодигидротioxрома, максимумы которых перекрываются, наблюдается также сильная флуоресценция окисленной формы рибофлавин с максимумом 550 нм [12–15]. Спектры флуоресценции тioxрома и оксодигидротioxрома перекрываются с длинноволновым максимумом поглощения рибофлавин (445 нм), что может ослаблять их флуоресценцию. Однако ослабление флуоресценции вследствие эффекта внутреннего фильтра становилось существенным лишь для концентраций рибофлавин более 5 мкМ. Поэтому количественные измерения концентрации тioxрома в присутствии рибофлавин проводили в разбавленных растворах, а эффектом внутреннего фильтра пренебрегали.

Следует также отметить, что при облучении раствора, содержащего тиамин и рибофлавин, свет при $\lambda = 436$ нм действовал значительно эффективнее, чем при $\lambda = 365$ нм. Однако в обоих случаях продукты фотолиза тиамин были одинаковыми.

При отсутствии рибофлавин в растворе в масс-спектре водного раствора тиамин как исходного, так и после облучения в течение 30 мин регистрируются молекулярные ионы тиамин с $m/z = 265,111$ и $m/z = 266,114$ (табл. 1). Первый молекулярный ион соответствует наиболее распространенному (82 %) изотопологу тиамин с мономолекулярной массой $M_0 = 265,1123$ а. е. м., тогда как второй – изотопологу с массой $M_1 = 266,1149$ а. е. м. и частотой встречаемости 12,7 % (табл. 2). Относительная интенсивность пиков молекулярных ионов в масс-спектре тиамин хорошо коррелирует с частотой встречаемости изотопологов.

В присутствии рибофлавин в масс-спектре среди продуктов окисления тиамин под действием видимого света регистрируются пики продуктов с $m/z = 263,096$ и $m/z = 279,091$ соответственно (рис. 4), значения которых совпадают со значениями m/z пиков протонированных молекулярных ионов $[M_0+H]^+$ тioxрома и оксодигидротioxрома соответственно (табл. 2). Кроме ионов $[M_0+H]^+$ в масс-спектре также обнаруживаются молекулярные ионы протонированных изотопологов $[M_1+H]^+$ тioxрома и оксодигидротioxрома, относительная интенсивность пиков которых составляет ~15 % от интенсивности пика ионов $[M_0+H]^+$. Следует подчеркнуть, что на рис. 4 приведены масс-спектры фракции с временем удерживания $R_t = 2,5$ – $2,7$ мин, поэтому в указанном спектре не фигурирует молекулярный ион рибофлавин. Структурные формулы

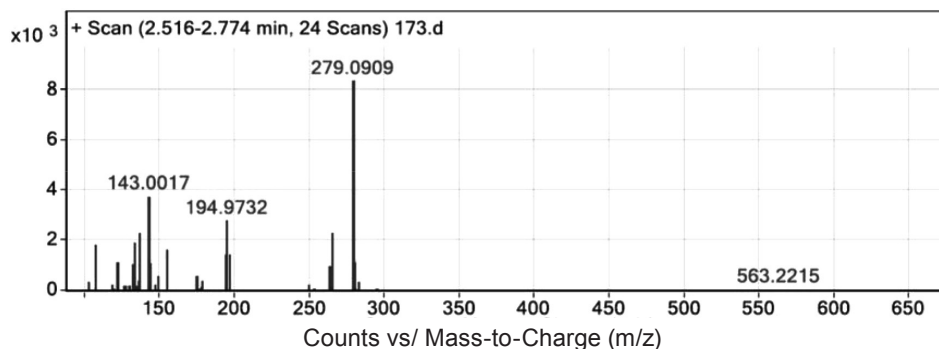


Рис. 4. Масс-спектр продуктов окисления тиамин, образовавшихся после облучения водных растворов тиамин в смеси с рибофлавином. Пик с $m/z = 263,096$ принадлежит молекулярному иону тиохрома $[M_0+H]^+$, пик $m/z = 279,091$ – молекулярному иону оксодигидротиохрома $[M_0+H]^+$, где M_0 – моноизотопная масса молекулы. Начальные концентрации тиамин и рибофлавин в растворе – 0,02 мМ. Раствор облучали 15 мин лампой СВД-120А со светофильтром УФС-6

Fig. 4. Mass-spectra of thiamine oxidation products, formed after irradiation of thiamine and riboflavin in water. Peak at $m/z = 263,096$ is assigned to molecular ion of thiochrome $[M_0+H]^+$, peak at $m/z = 279,091$ – to molecular ion of oxodihydrothiochrome $[M_0+H]^+$, where M_0 – monoisotopic mass. Initial concentrations of thiamine and riboflavin in the solution were 0.05 mM. The solution was exposed for 15 min to visible light of high-pressure mercury lamp SVD-120A using UFS-6 light filter

продуктов фотолиза тиамин и тиохрома, а также значения масс изотопологов и m/z молекулярных ионов приведены в табл. 2. Кроме молекулярных ионов тиамин, тиохрома и оксодигидротиохрома, тиаминдисульфида в масс-спектрах облученных растворов тиамин присутствуют фрагменты молекулы тиамин. Наиболее интенсивные пики имеют значения m/z , равные 122,0711 и 143,0017 соответственно.

Таблица 1. Значения m/z и интенсивности пиков продуктов фотосенсибилизированного рибофлавином окисления тиамин (Т) и тиохрома (ТChr) под действием ультрафиолета и видимого света ($\lambda > 300$ нм, облучение в стеклянной кювете)

Table 1. Values of m/z and corresponding peak intensities of riboflavin-photosensitized thiamine and TChr oxidation products under exposure to ultraviolet and visible light (spectral range $\lambda > 300$ nm, irradiation in a glass cell)

Состав раствора и время воздействия UVA	Т	ТChr	ODTChr	TSST
	$m/z = 265,111 [M_0]^+$, $m/z = 266,114 [M_1]^+$	$m/z = 263,096 [M_0+H]^+$	$m/z = 279,091 [M_0+H]^+$	$m/z = 563,221 [M_0+H]^+$
Т (100 мкМ), 0 мин	71811			
Т (100 мкМ) + RF (100 мкМ), 30 мин	57855	988	9 550	6 899
ТChr (50 мкМ), 0 мин		186111	2901	
ТChr (50 мкМ), 30 мин		170493	20498	
ТChr (50 мкМ) + RF (50 мкМ), 0 мин		185211	3700	
ТChr (50 мкМ) + RF (50 мкМ), 5 мин		122557	70582	
ТChr (50 мкМ) + RF (50 мкМ), 30 мин		328	89 985	
ТChr (50 мкМ) + RF (50 мкМ) + N_3^- (1 мМ), 30 мин			118 720	

Данные масс-спектрологии подтверждают результаты о сенсибилизированном рибофлавином окислении тиамин с образованием тиохрома и оксодигидротиохрома, а также тиохрома с образованием оксодигидротиохрома, полученные спектрально-флуоресцентными методами (табл. 1, 3).

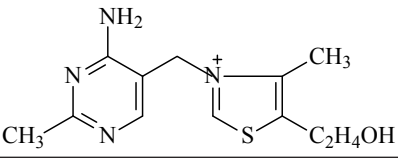
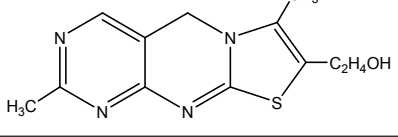
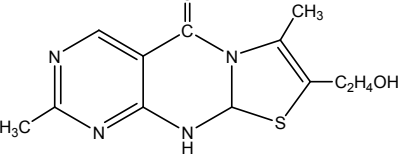
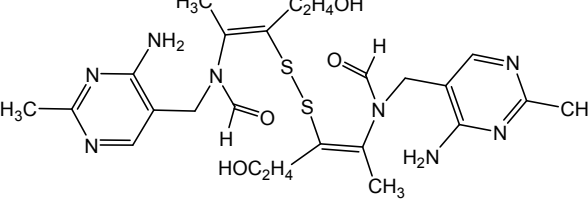
В аэробных условиях происходит эффективное тушение кислородом триплетных уровней рибофлавин с образованием синглетного кислорода: ${}^3RF + O_2 \rightarrow RF + {}^1O_2$.

Константа скорости тушения триплетных состояний флавиновых сенсибилизаторов кислородом равна $(1-3) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [2]. Поэтому можно предположить, что в окислении тиамин в тиохром участие RF в триплетном состоянии крайне незначительно вследствие эффективного тушения триплетных состояний растворенным в воде кислородом. Мы предполагаем, что вслед-

ствии протекания фотосенсибилизированных рибофлавином реакций образование тиохрома в водных растворах тиамин происходит под действием синглетного кислорода. Молекулы тиамин с закрытым тиазоловым циклом находятся в равновесии с трициклической и тиольной формами тиамин [12]. Причем равновесная концентрация тиольной формы тиамин при pH = 7,0 не превышает 2,0 % от общей концентрации тиамин в водном растворе. Тиольная форма тиамин легко окисляется супероксид анионами и синглетным кислородом с образованием дисульфида тиамин [12]. В табл. 1 приведены интенсивности пиков тиаминдисульфида, образованного после воздействия видимого света на водные растворы тиамин в смеси с рибофлавином.

Таблица 2. Структурные формулы тиамин, продуктов его окислительной трансформации и соответствующие величины масс изотопологов и m/z молекулярных ионов

Table 2. Structural formulas of thiamine, products of its oxidative transformation, corresponding masses of isotopologues and m/z values for their molecular ions

Соединение, масса изотопологов (частота встречаемости)	Структурная формула	m/z молекулярных ионов (относительная интенсивность)
Тиамин $M_0 = 265,1123$ (81,8 %) $M_1 = 266,1149$ (12,7 %) $M_2 = 267,1102$ (4,7 %)		$265,111 [M_0]^+$ (100 %) $266,114 [M_1]^+$ (13 %) $267,108 [M_2]^+$ (3 %)
Тиохром $M_0 = 262,0888$ (81,9 %) $M_1 = 263,0914$ (12,6 %) $M_2 = 264,0867$ (4,7 %)		$263,096 [M_0+H]^+$ (100 %) $264,097 [M_1+H]^+$ (15 %)
Оксидигидротиохром $M_0 = 278,0837$ (81,7 %) $M_1 = 279,0863$ (12,6 %) $M_2 = 280,0819$ (4,9 %)		$279,091 [M_0+H]^+$ (100 %) $280,094 [M_1+H]^+$ (14 %)
Тиаминдисульфид $M_0 = 562,2144$ (66,8 %) $M_1 = 563,2170$ (20,7 %) $M_2 = 564,2137$ (9,6 %)		$563,219 [M_0+H]^+$ (100 %) $564,226 [M_1+H]^+$ (23 %)

Предполагаемый механизм реакции окисления трициклической формы тиамин (ТФТ) в тиохром под действием синглетного кислорода ($TFT + {}^1O_2 \rightarrow TChr + H_2O_2 + H_2O$) схематично представлен на рис. 5.

Как известно, синглетный кислород легко тушится азидом. Константа скорости тушения синглетного кислорода азидом натрия, по данным литературы, равна $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ [2]. Азид натрия широко известен как эффективный тушитель синглетного кислорода, полученного как химическими, так и физическими методами. Поэтому можно предположить, что добавление азид натрия в раствор, содержащий RF и тиамин, облучаемый видимым светом, позволит выяснить, протекает ли образование тиохрома только лишь под действием синглетного кислорода. Действительно, после добавления азид резко снижается выход тиохрома после воздействия ультрафиолета на водные растворы, содержащие тиамин и рибофлавин. В то же время полного ингибирования образования тиохрома не происходит даже при концентрации азид 1 мМ (рис. 6).

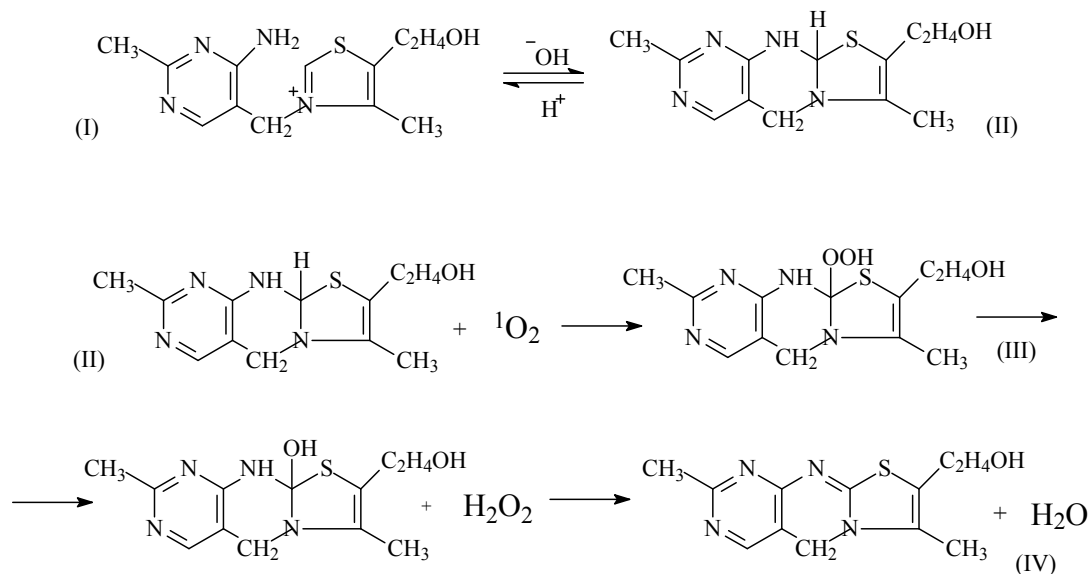


Рис. 5. Предполагаемая схема окисления тиаминa под действием синглетного кислорода.

(I) – катионная форма тиаминa с закрытым тиазоловым циклом; (II) – трициклическая форма тиаминa;
(III) – пероксидная форма трициклической формы тиаминa; (IV) – тиохром

Fig. 5. Proposed scheme of thiamine oxidation by singlet oxygen. (I) – cationic form of thiamine with closed thiazole ring;
(II) – tricyclic form of thiamine; (III) – peroxide form of the tricyclic form of thiamine; (IV) – thiochrome

Более высокие концентрации азидa еще больше снижают выход тиохрома. Поэтому можно предположить, что фотосенсибилизированное рибофлавином окисление тиаминa в тиохром происходит под действием синглетного кислорода. Вероятно, участие триплетных состояний рибофлавина в прямой реакции с тиамином, приводящей к окислению последнего в тиохром, весьма незначительно (рис. 6, кривая 2) вследствие эффективного тушения триплетных состояний растворенным в воде кислородом. Мы предполагаем, что образование небольших количеств тиохрома в растворах тиаминa в смеси с рибофлавином (рис. 6, кривая 1), а также в растворах тиаминa в смеси с рибофлавином и азидом (рис. 6, кривая 2) до начала облучения может быть вызвано воздействием рассеянного комнатного света в процессе их приготовления.

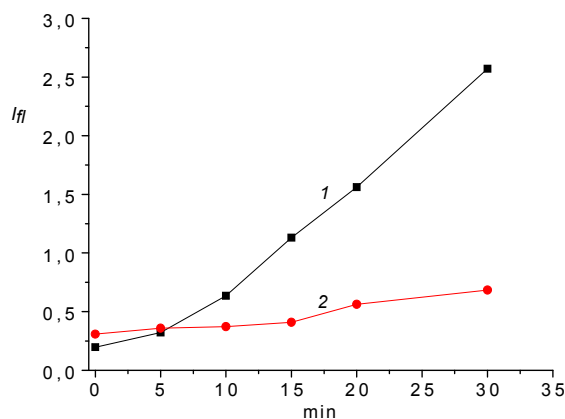


Рис. 6. Образование тиохрома, регистрируемого флуоресцентным методом, в зависимости от времени облучения водных растворов тиаминa в смеси с рибофлавином (1), тиаминa в смеси с рибофлавином и азидом (2) в атмосфере воздуха. Начальная концентрация тиаминa, рибофлавина – 0,1 мМ, азидa – 1,0 мМ. Облучение растворов лампой СВД-120А проводили в стеклянной кювете. Длина волны возбуждения – 360 нм, флуоресценции – 450 нм

Fig. 6. Dependence of thiochrome formation (measured by fluorescence) on irradiation time in aqueous solutions of thiamine with riboflavin (1) and of thiamine mixture with riboflavin and azide (2) in air atmosphere. Initial concentrations of thiamine and riboflavin were 0.1 mM, azide – 1.0 mM. The solutions were irradiated in a glass cell by SVD-120A lamp. Excitation wavelength – 360 nm, emission – 450 nm

После удаления кислорода сульфитом (5 мМ) наблюдали очень малый выход тиохрома при воздействии ультрафиолета и видимого излучения на водные растворы тиамин в присутствии рибофлавина. Это свидетельствует о том, что триплетные состояния рибофлавина вносят малый вклад или вообще не участвуют в процессе окисления тиамин и превращения его в тиохром.

Образовавшийся тиохром претерпевает дальнейшие превращения в присутствии рибофлавина при облучении светом и окисляется до оксодигидротиохрома (см. табл. 1, 3).

Фотосенсибилизированное рибофлавином окисление тиохрома в водных растворах при воздействии ультрафиолета UVA и видимого излучения в аэробных и анаэробных условиях. Водные растворы тиохрома в атмосфере воздуха стабильны к действию ультрафиолета UVA и видимого излучения. Облучение водных растворов тиохрома в присутствии рибофлавина вызывает окисление тиохрома в оксодигидротиохром, что сопровождается снижением интенсивности флуоресценции тиохрома. В табл. 3 приведены данные об изменении содержания тиохрома и оксодигидротиохрома в растворе в зависимости от времени воздействия электромагнитного излучения. Данные масс-спектрологии (см. табл. 1) также свидетельствуют об образовании оксодигидротиохрома после облучения водных растворов тиохрома в смеси с рибофлавином UVA и видимым светом. В присутствии рибофлавина наблюдали быстрое окисление тиохрома в оксодигидротиохром. В начальные же промежутки времени воздействия ультрафиолета UVA наблюдали приблизительно одинаковое снижение концентрации тиохрома и, соответственно, такое же возрастание концентрации образовавшегося оксодигидротиохрома (табл. 3). Последующее облучение растворов сопровождалось снижением выхода оксодигидротиохрома. Это свидетельствует о том, что оксодигидротиохром – не конечный продукт фотолиза тиохрома, а идет дальнейший процесс его превращения (см. табл. 1).

Т а б л и ц а 3. Ингибирование азидом окисления тиохрома в оксодигидротиохром, фотосенсибилизированного рибофлавином, в аэробных условиях

Table 3. Azide inhibition of riboflavin-photosensitized oxidation of thiochrome (TChr) to oxodihydrothiochrome (ODTChr) under aerobic conditions

Состав раствора	Время воздействия, мин	Концентрация TChr, мкМ	Концентрация ODTChr, мкМ
TChr + RF	0	50,0	0
TChr + RF	5	25,5	24,5
TChr + RF	10	14,1	35,9
TChr + RF + N ₃ ⁻	5	36,5	13,5
TChr + RF + N ₃ ⁻	10	24,6	25,4

П р и м е ч а н и е. Начальная концентрация рибофлавина и тиохрома в растворе – 50 мкМ, азид натрия – 1,0 мМ. Водные растворы в атмосфере воздуха облучали светом лампы СВД-120А ($\lambda > 300$ нм, светофильтр СЗС22). Облученные растворы перед измерением концентрации тиохрома и оксодигидротиохрома разбавляли в 10 раз.

Азид ингибирует окисление тиохрома в оксодигидротиохром в фотореакциях, сенсибилизированных рибофлавином (табл. 3). Однако вклад синглетного кислорода в окисление тиохрома в процентном соотношении значительно меньше, нежели вклад синглетного кислорода в окисление тиамин. В присутствии азид (1,0 мМ) выход тиохрома при фотосенсибилизированном рибофлавином окислении тиамин снижается в 4–5 раз (рис. 6). При фотосенсибилизированном рибофлавином окислении тиохрома выход оксодигидротиохрома в присутствии азид той же концентрации снижается только на 50 % (табл. 3). Метод масс-спектрологии также показывает, что окисление тиохрома с образованием оксодигидротиохрома происходит при облучении тиохрома в присутствии азид (см. табл. 1). Таким образом, в случае сенсибилизированного рибофлавином окисления тиохрома наблюдается совсем другая ситуация, чем при окислении тиамин.

Полученные результаты позволяют предположить, что в окислении тиохрома в оксодигидротиохром наряду с синглетным кислородом участвуют и молекулы рибофлавина в триплетном

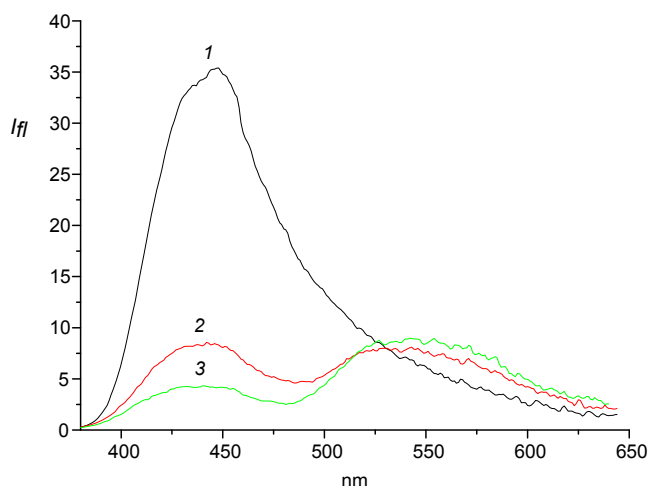


Рис. 7. Спектры флуоресценции водных растворов тиохрома в смеси с рибофлавином и сульфитом натрия в зависимости от времени облучения растворов светом лампы СВД-120А. Время облучения – 5 мин (1), 15 мин (2), 30 мин (3). Растворы облучали в стеклянной кювете. Концентрация тиохрома и рибофлавина – 20 мкМ, концентрация сульфита натрия – 5 мМ, 0,05 мМ фосфатный буфер, pH = 7,0. Возбуждение флуоресценции тиохрома проводили при 360 нм

Fig. 7. Fluorescence spectra of thiochrome aqueous solutions in mixture with riboflavin and sodium sulfite depending on time of irradiation by SVD-120A lamp. The irradiation times were 5 min (1), 15 min (2), 30 min (3). The solutions were irradiated in a glass cell. The concentrations of thiochrome and riboflavin were 20 μ M, sodium sulfite – 5 mM, 0.05 mM phosphate buffer, pH 7.0. Thiochrome fluorescence was excited at 360 nm

состоянии. Действительно, фотосенсибилизированное окисление тиохрома в оксидигидро-тиохром происходит и после удаления растворенного кислорода сульфитом.

При воздействии ультрафиолета и видимого излучения на водные растворы тиохрома и рибофлавина в присутствии 5 мМ сульфита наблюдали быстрое обесцвечивание рибофлавина и полное превращение тиохрома в оксидигидро-тиохром (рис. 7). Лейко-форма рибофлавина не флуоресцирует. Интенсивность флуоресценции тиохрома при облучении снижается примерно на порядок (рис. 7) и наблюдается сдвиг максимума флуоресценции с 450 до 440 нм, что свидетельствует об образовании оксидигидро-тиохрома. Как известно, квантовые выходы флуоресценции тиохрома и оксидигидро-тиохрома в водных растворах равны соответственно 0,28 и 0,03 [10]. Спектр поглощения рибофлавина в окисленной форме имеет максимумы при 266, 373 и 445 нм (см. рис. 2).

Двуэлектронное восстановление рибофлавина приводит к почти полному исчезновению полосы при 450 нм (рис. 7) и частичному уменьшению поглощения при 266 и 373 нм [12, 15]. Следует отметить, что частичное восстановление рибофлавина сульфитом наблюдается в анаэробных условиях уже до начала облучения. Если удалять растворенный кислород путем барботирования струей азота, то удастся избежать частичного восстановления рибофлавина до начала облучения растворов. После барботирования облученных растворов струей воздуха лейко-форма рибофлавина переходит в окисленную форму, спектр поглощения рибофлавина приобретает первоначальную форму и цвет раствора восстанавливается. После насыщения растворов воздухом интенсивность флуоресценции рибофлавина также возвращается к первоначальному уровню (рис. 8).

Суммируя полученные результаты, можно предположить, что в анаэробных условиях молекула рибофлавина в триплетном состоянии захватывает электроны от донора – молекулы тиохрома. В результате образуются семихинонная свободнорадикальная форма рибофлавина \cdot RFH и свободнорадикальная форма тиохрома: $RF + h\nu \rightarrow {}^3RF + TChr \rightarrow \cdot TChr + \cdot RFH$. Далее семихинонная форма рибофлавина или молекула рибофлавина в триплетном состоянии отрывает еще один водород от донора с образованием оксидигидро-тиохрома и бесцветной лейко-формы рибофлавина. В результате данных реакций молекула тиохрома окисляется в оксидигидро-тиохром: $\cdot TChr + {}^3RF + H_2O \rightarrow \cdot RFH + ODTChr$, $\cdot TChr + \cdot RFH + H_2O \rightarrow RFH_2 + ODTChr$.

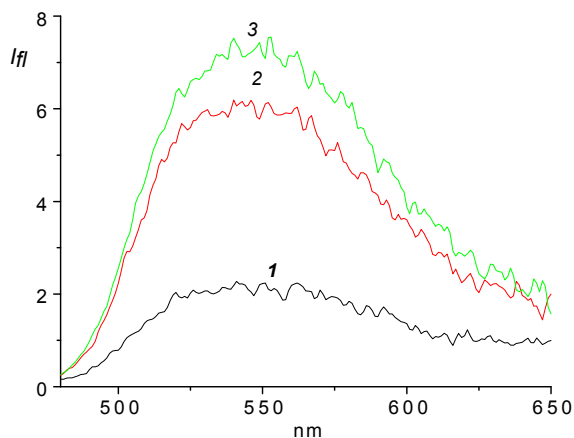


Рис. 8. Спектры флуоресценции рибофлавина для различных времен после облучения видимым светом водных растворов тиохрома в смеси с рибофлавином и сульфитом. Растворы облучали в стеклянной кювете. Концентрация тиохрома и рибофлавина – 0,1 мМ, сульфита – 5 мМ, 0,05 мМ фосфатный буфер, pH = 7,0. Возбуждение флуоресценции рибофлавина при 460 нм. Время облучения – 0 мин (1), 15 мин (2), 30 мин (3)

Fig. 8. Fluorescence spectra of riboflavin at different times after visible light irradiation of thiochrome aqueous solutions in mixture with riboflavin and sulfite. The solutions were irradiated in a glass cell. Concentrations of thiochrome and riboflavin were 0.1 mM, sulfite – 5 mM, 0.05 mM phosphate buffer, pH 7.0. Excitation of riboflavin fluorescence was at 460 nm. Exposition times were 0 min (1), 15 min (2); 30 min (3)

Лейко-форма рибофлавина образуется вследствие протекания реакции диспропорционирования семихинонных форм рибофлавина: $2 \cdot \text{RFH} \rightarrow \text{RFH}_2 + \text{RF}$.

Семихинонная и лейко-формы рибофлавина взаимодействуют с кислородом с образованием супероксиданионов, пероксида водорода и окисленной формы рибофлавина [12]: $\cdot \text{RFH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{RF} + \text{HO}_2$. Образовавшийся вследствие этой реакции пероксидный радикал кислорода HO_2 неустойчив и легко диссоциирует на супероксид анион и протон (pH = 4,7). Поэтому в нейтральной среде при pH = 7,0 их равновесные концентрации составляют 99,5 % ($\text{O}_2^{\cdot -}$) и 0,5 % (HO_2) соответственно. Следовательно, в нейтральной среде будет присутствовать преимущественно диссоциированная форма – супероксид анион-радикалы ($\text{O}_2^{\cdot -}$).

Лейко-форма рибофлавина под действием кислорода также переходит в окисленную форму рибофлавина: $\text{RFH}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{RF} + \text{H}_2\text{O}_2$. Поэтому после насыщения воздухом облученных растворов рибофлавина в смеси с тиохромом форма спектра поглощения смеси восстанавливается до первоначального вида.

Обсуждение. Рибофлавин, один из компонентов B_2 -витаминного комплекса, присутствует в живых организмах в свободной форме, а также в виде флавин мононуклеотида (FMN) и флавин аденинмононуклеотида (FAD) во всех аэробных клетках. Эти нуклеотидные формы рибофлавина являются простетическими группами целого класса окислительно-восстановительных ферментов. Флавопротеиды распространены повсеместно.

Как известно, рибофлавин, витамин B_2 , при облучении видимым светом образует активные формы кислорода [13–15]. Он выступает в роли фотосенсибилизатора, взаимодействует с кислородом и переводит молекулу кислорода в электронно-возбужденное синглетное состояние. Синглетный кислород генерируется благодаря переносу энергии с возбужденного триплетного состояния молекулы рибофлавина на молекулу кислорода в триплетном (основном) состоянии. Синглетный кислород окисляет многие субстраты, в том числе фенолы, ароматические аминокислоты, пептиды, инактивирует многие ферменты [2, 13, 14]. Под действием синглетного кислорода поражаются такие организмы, как вирусы, бактерии, грибы, многоклеточные растения и животные [2, 13, 15].

Сенсибилизированные рибофлавином фотохимические реакции, вероятно, протекают также *in vivo*. Рибофлавин поглощает видимый свет, проходящий сквозь кожу, воздействует на структурные компоненты глаза и образует фотовозбужденные состояния, которые генерируют активные формы кислорода, свободные радикалы рибофлавина.

Вероятно, рибофлавин может играть роль эндогенного инактиватора различных патогенов, в том числе вирусов и бактерий, например, в крови [16]. Несмотря на то что физиологическая концентрация рибофлавина в тканях весьма невелика для значительной фотосенсибилизирующей активности в клеточных структурах, это соединение может быть эндогенным клеточным фотосенсибилизатором как *in vivo*, так и *in vitro* [17, 18].

Высокий уровень интенсивности ультрафиолета или видимого излучения в присутствии фотосенсибилизаторов способен генерировать избыточные количества свободных радикалов и активных форм кислорода и вызывать повреждение белковых макромолекул и клеточных структур [13–18]. В организме человека некоторые нарушения могут быть связаны с одновременным применением фоточувствительных лекарств и фотосенсибилизаторов. Например, интенсивный видимый свет в присутствии фотосенсибилизаторов (витамина В₂) способен уменьшить содержание в крови некоторых биологически активных соединений [2, 15]. Как видно из представленных данных, наблюдается окисление тиамин с образованием тиохрома под действием видимого света в присутствии рибофлавина. Окисление тиамин в тиохром происходит в основном в аэробных условиях под действием синглетного кислорода. В анаэробных условиях тиамин в присутствии рибофлавина не окисляется при воздействии ультрафиолета и видимого излучения.

Совсем другая ситуация в случае тиохрома. При воздействии ультрафиолета и видимого излучения на водные растворы тиохрома и рибофлавина в присутствии 5 мМ сульфита наблюдали быстрое обесцвечивание рибофлавина и полное превращение тиохрома в оксодигидротиохром. Это свидетельствует об участии молекул рибофлавина в триплетном состоянии в окислении тиохрома.

Как известно, продолжительное воздействие ультрафиолетового излучения на глаз вызывает образование активных форм кислорода, которые, скорее всего, и ответственны за развитие различных дегенеративных процессов, в том числе катаракты. Защитные механизмы против повреждающего действия окислительного стресса, вызванного излучением, включают прямой перехват свободных радикалов, возрастание продукции НАД(Р)Н, поглощение ультрафиолета [19]. Внешняя поверхность роговицы покрыта многослойным эпителием, который играет роль барьера, отделяющего внутренние структуры глаза от внешней среды, препятствует всасыванию слезной жидкости, является фильтром, ослабляющим повреждающее действие ультрафиолетового излучения [1, 19, 20]. Тиамин и тиамин-зависимые ферменты, вероятно, играют важную роль в защите роговицы и хрусталика глаза от повреждения активными формами кислорода и азота. В метаболизме роговицы преобладает фосфоглюконатный окислительный путь, который использует более 50 % потребляемой глюкозы. Транскетолаза, тиамин-зависимый ключевой фермент фосфоглюконатного окислительного пути, составляет 10–15 % от общего количества водорастворимых ферментов роговицы мышей. Фосфоглюконатный путь, наряду с гликолизом, также играет важную роль в обмене углеводов в хрусталике [19, 21].

Заключение. Нами установлено, что не только UVA ультрафиолет, но и интенсивный видимый свет в присутствии фотосенсибилизатора рибофлавина (витамина В₂) способен снизить содержание тиамин в крови, а также в клеточных структурах глаза.

Снижение концентрации тиаминдифосфата может происходить не только вследствие прямого действия ультрафиолета на молекулу кофермента, но и вследствие его окисления в дифосфаты тиохрома и оксодигидротиохрома синглетным кислородом.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № М18-157) и Государственной программы научных исследований «Химические технологии и материалы» (задание 5.28).

Acknowledgements. This work was supported by Belarusian Foundation for Basic Research (grant M18-157) and State program of scientific research «Chemical Technologies and Materials» (project 5.28).

Список использованных источников

1. Davies, M. J. Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis / M. J. Davies, J. W. Truscott // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. – 2001. – Vol. 63, N 1–3. – P. 114–125. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(01\)00208-1](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(01)00208-1)
2. Фут, Х. Фотосенсибилизированное окисление и синглетный кислород. Биологические следствия / Х. Фут // Свободные радикалы в биологии / ред. У. Прайор. – М., 1979. – С. 96–143.

3. Красновский, А. А. Фотодинамическая регуляция биологических процессов: первичные механизмы / А. А. Красновский // Проблемы регуляции в биологических системах / под общ. ред. А. Б. Рубина. – М. ; Ижевск, 2006. – С. 223–254.
4. 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 // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2000. – Vol. 903, N 1. – P. 353–356. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06386.x>
5. 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. <https://doi.org/10.1267/ahc.33.67>
6. Frederikse, P. H. Thiamine deficiency *in vivo* produces fiber cell degeneration in mouse lenses / P. H. Frederikse, P. Farnsworth, J. S. Zigler // *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1999. – Vol. 258, N 3. – P. 703–707. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0560>
7. Ингибирование тиамином фотолиза тирозина, триптофана, тирозинильных и триптофанильных остатков белков под действием ультрафиолета / И. И. Степуро [и др.] // Посттрансляционная модификация белков : ст. участников Белорус.-пол.-лит. семинара «Биохимия и молекулярная биология», 11–12 мая 2017 г. / редкол. : Л. И. Надольник (гл. ред.) [и др.]. – Гродно, 2017. – С. 68–86.
8. Photosensitized formation of singlet oxygen by vitamins of the B group / B. M. Dzhagarov [et al.] // *J. Appl. Spectroscopy.* – 1995. – Vol. 62, N 2. – P. 285–289. <https://doi.org/10.1007/bf02606482>
9. Natera, J. Vitamin B₁ as a scavenger of reactive oxygen species photogenerated by vitamin B₂ / J. Natera, W. A. Massad, N. A. García // *Photochem. Photobiol.* – 2011. – Vol. 87, N 2. – P. 317–323. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00867.x>
10. 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. <https://doi.org/10.1134/s0006297912010051>
11. 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.
12. Мецлер, Д. Биохимия. Химические реакции в живой клетке : в 3 т. / Д. Мецлер. – М. : Мир, 1980. – Т. 2. – 606 с.
13. Edvards, A. Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids / A. Edvards, E. Silva // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* – 2001. – Vol. 63, N 1–3. – P. 126–131. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(01\)00209-3](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(01)00209-3)
14. Generation and photosensitization properties of oxidized radicals of riboflavin: a laser flash photolysis study / C.-Y. Lu [et al.] // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* – 1999. – Vol. 52, N 1–3. – P. 111–116. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(99\)00111-6](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(99)00111-6)
15. Insińska-Rak, M. Riboflavin interactions with oxygen – a survey from the photochemical perspective / M. Insińska-Rak, M. Sikorski // *Chem. Eur. J.* – 2014. – Vol. 20, N 47. – P. 15280–15291. <https://doi.org/10.1002/chem.201403895>
16. Corbin, F. Pathogen inactivation of blood components: current status and introduction of an approach using riboflavin as a photosensitizer / F. Corbin // *Int. J. Hematol.* – 2002. – Vol. 76, N S2. – P. 253–257. <https://doi.org/10.1007/bf03165125>
17. Iqbal, J. Photooxidation of acyclovir with thermally generated triplet excited ketones. A comparison with type I and II photosensitizers / J. Iqbal, A. Husain, A. Gupta // *Chem. Pharm. Bull.* – 2006. – Vol. 54, N 4. – P. 519–521. <https://doi.org/10.1248/cpb.54.519>
18. Supramolecular photonic therapeutic agents / S. O. McDonnell [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – Vol. 127, N 47. – P. 16360–16361. <https://doi.org/10.1021/ja0553497>
19. The role of corneal crystallins in the cellular defense mechanisms against oxidative stress / N. Lassen [et al.] // *Seminars Cell Develop. Biol.* – 2008. – Vol. 19, N 2. – P. 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.semedb.2007.10.004>
20. Островский, М. А. Молекулярные механизмы повреждающего действия света на структуры глаза и системы защиты от такого повреждения / М. А. Островский // *Успехи биол. химии.* – 2005. – Т. 45. – С. 173–204.
21. Основы биохимии : в 3 т. / А. Уайт [и др.]. – М. : Мир, 1981. – Т. 3. – 726 с.

References

1. Davies M. J., Davies J. M., Truscott J. W. Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology*, 2001, vol. 63, no. 1–3, pp. 114–125. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(01\)00208-1](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(01)00208-1)
2. Fut kh. Photosensitized oxidation and singlet oxygen. Biological consequences. *Svobodnye radikaly v biologii* [Free radicals in biology]. Moscow, 1979, pp. 96–143 (in Russian).
3. Krasnovskii A. A. Photochemical regulation of biological processes: primary mechanisms. *Problemy regulyatsii v biologicheskikh sistemakh* [Problems of regulation in biological systems]. Moscow, Izhevsk, 2006, pp. 223–254 (in Russian).
4. 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, no. 1, pp. 353–356. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06386.x>
5. Matsushita H., Takeuchi Y., Kosaka K., Fushiki S., 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. <https://doi.org/10.1267/ahc.33.67>
6. Frederikse P. H., Farnsworth P., Zigler J. S. Thiamine deficiency *in vivo* produces fiber cell degeneration in mouse lenses. *Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, vol. 258, no. 3, pp. 703–707. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0560>

7. Stepuro I. I., Labor S. A., Stepuro V. I., Smirnov V. Yu. Thiamine inhibition of photolysis of tyrosine, tryptophane, tyrosinyl and tryptophanyl protein residues on exposure to ultraviolet. *Posttranslyatsionnaya modifikatsiya belkov: stat'i uchastnikov Belorussko-pol'sko-litovskogo seminar «Biokhimiya i molekulyarnaya biologiya» (Grodno, 11–12 maya 2017 goda)* [Post-translational modification of proteins: articles of participants in the Belarusian-Polish-Lithuanian seminar “Biochemistry and Molecular Biology” (Grodno, May 11–12, 2017)]. Grodno, 2017, pp. 68–86 (in Russian).
8. Dzhagarov B. M., Kruk N. N., Konovalova N. V., Solodunov A. A., Stepuro I. I. Photosensitized formation of singlet oxygen by vitamins of the B group. *Journal of Applied Spectroscopy*, 1995, vol. 62, no. 2, pp. 285–289. <https://doi.org/10.1007/bf02606482>
9. Natera J., Massad W. A., García N. A. Vitamin B₁ as a scavenger of reactive oxygen species photogenerated by vitamin B₂. *Photochemistry and Photobiology*, 2011, vol. 87, no. 2, pp. 317–323. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00867.x>
10. 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. <https://doi.org/10.1134/s0006297912010051>
11. 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.
12. Metzler D. E. *Biochemistry. The Chemical Reactions of Living Cells*. New York, Academic Press, 1977. 1164 p.
13. Edwards A., Silva E. Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology*, 2001, vol. 63, no. 1–3, pp. 126–131. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(01\)00209-3](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(01)00209-3)
14. Lu C.-Y., Wang W.-F., Lin W.-Z., Han Z.-H., Yao S.-D., Lin N.-Y. Generation and photosensitization properties of oxidized radicals of riboflavin: a laser flash photolysis study. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology*, 1999, vol. 52, no. 1–3, pp. 111–116. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(99\)00111-6](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(99)00111-6)
15. Insińska-Rak M., Sikorski M. Riboflavin Interactions with oxygen – a survey from the photochemical perspective. *Chemistry – A European Journal*, 2014, vol. 20, no. 47, pp. 15280–15291. <https://doi.org/10.1002/chem.201403895>
16. Corbin F. Pathogen inactivation of blood components: current status and introduction of an approach using riboflavin as a photosensitizer. *International Journal of Hematology*, 2002, vol. 76, no. S2, pp. 253–257. <https://doi.org/10.1007/bf03165125>
17. Iqbal J., Husain A., Gupta A. Photooxidation of acyclovir with thermally generated triplet excited ketones. A comparison with type I and II photosensitizers. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2006, vol. 54, no. 4, pp. 519–521. <https://doi.org/10.1248/cpb.54.519>
18. McDonnell S. O., Hall M. J., Allen L. T., Byrne A., Gallagher W. M., O’Shea D. F. Supramolecular photonic therapeutic agents. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, vol. 127, no. 47, pp. 16360–16361. <https://doi.org/10.1021/ja0553497>
19. Lassen N., Black W. J., Estey T., Vasiliou V. The role of corneal crystallins in the cellular defense mechanisms against oxidative stress. Seminars in cell and developmental biology. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2008, vol. 19, no. 2, pp. 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2007.10.004>
20. Ostrovskii M. A. Molecular mechanisms of damaging effect of light on eye structures and systems of protection against this damage. *Uspekhi biologicheskoi khimii* [Advances in biological chemistry], 2005, vol. 45, pp. 173–204 (in Russian).
21. White A., Handler P., Smith E. L., Hill R. L., Lehman I. R. *Principles of biochemistry. 4th ed.* New York, McGraw-Hill, 1968. 1187 p.

Информация об авторах

Степура Иван Иванович – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (БЛК, 50, 230030, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: scepora@gmail.com

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

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

Янцевич Алексей Викторович – 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.), Associated Professor, Head of the Laboratory. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (BLK, 50, 230030, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: scepora@gmail.com

Svetlana A. Labor – 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

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

Aleksey V. Yantsevich – 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).