

# ОГЛЯДИ

УДК 577.127

## ОКИСЛЕННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ТИАМИНА: ОБРАЗОВАНИЕ, СВОЙСТВА, БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ

Ю. М. ПАРХОМЕНКО<sup>1</sup>, И. И. СТЕПУРО<sup>2</sup>, Г. В. ДОНЧЕНКО<sup>1</sup>, В. И. СТЕПУРО<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;  
e-mail: yupark@biochem.kiev.ua;

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси (филиал), Гродно;  
e-mail: biophyz@biochem.unibel.by;

<sup>3</sup>Гродненский госуниверситет им. Янки Купалы, Беларусь;  
e-mail: vstepuro@grsu.by

*В обзоре впервые обобщены и проанализированы имеющиеся в литературе сведения об образовании, свойствах, биологической роли и практическом применении окисленных производных витамина В<sub>1</sub> (тиамина). Известно, что при значениях рН > 7,0 молекула тиамин способна вступать в двухстадийную реакцию раскрытия тиазольевого кольца с образованием тиольной формы тиамин и нестабильной трициклической формы. При наличии окислителей в щелочной среде тиольная форма окисляется до тиаминдисульфида, трициклическая — до тиохром. Окислительной трансформации тиамин способствуют феноксильные радикалы, уровень которых в тканях животных может существенно повышаться при различных стрессах, когда резко возрастает уровень активных форм кислорода и оксоферрильных форм гемопротеинов. На основании данных литературы можно предположить, что тиамин и его гидрофобный метаболит — тиохром — при определенных условиях выполняют важную антиоксидантную функцию в защите клеточных структур от повреждающего действия пероксинитрита, диоксида азота, пероксида. Присутствие окисленных метаболитов тиамин и его фосфатов в клетках животных, пусть даже и в незначительных количествах, является установленным фактом, а, следовательно, нельзя исключать возможность их регуляторного влияния на клеточные процессы, опосредованного специфическим взаимодействием этих соединений с клеточными структурами или протеинами.*

*Ключевые слова:* тиамин, тиаминдисульфид, дисульфид тиаминдифосфата, тиольная и трициклическая формы тиамин, тиохром, феноксильные радикалы, оксоферрильные формы гемопротеинов.

**Т**иамин (витамин В<sub>1</sub>) — один из ключевых факторов клеточного метаболизма благодаря тому, что его фосфорилированное производное — тиаминдифосфат (ТДФ) является коэнзимом нескольких энзимов углеводного обмена, среди которых наиболее распространенные и функционально значимые — транскетолаза и комплексы дегидрогеназ  $\alpha$ -кетокислот [1]. Ключевым промежуточным продуктом в реакциях, катализируемых ТДФ-зависимыми энзимами, является биполярный ион (илид) тиазолия, образующийся вследствие отщепления протона. Анионный центр биполярного иона, который стабилизируется соседним позитивным зарядом атома азота тиазолия, может реагировать с субстратом, таким как  $\alpha$ -кетокислота или  $\alpha$ -кетоспирт

( $\alpha$ -кетол), присоединенного по карбонильной группе [1, 2].

Долгое время коэнзимная функция считалась основной биохимической функцией тиамин. Однако постепенно накапливалась информация о наличии в живых объектах кроме ТДФ и свободного тиамин и других производных тиамин, что наводит на мысль о том, что коэнзимная функция может быть не единственной. В тканях животных тиамин, в основном, находится в свободном виде и в форме фосфорных эфиров (моно-, ди- и трифосфатов тиамин) [1]. В незначительном количестве в биологических объектах определяются парные и смешанные дисульфиды тиамин и тиохром [3]. Способность молекулы тиамин подвергаться окислительно-восстано-

вительным превращениям привлекла внимание ученых еще на заре изучения биохимии этого витамина [4]. Было найдено, что тиамин и его фосфаты в слабо щелочных условиях легко взаимодействуют с низкомолекулярными тиолами, такими как цистеин, глутатион, аллицин, образуя соответствующие смешанные дисульфиды [5, 6]. Исследования показали, что дисульфидные производные тиамин легко усваиваются организмом животных, полностью восполняя дефицит витамина [1, 7], однако в изолированных системах коферментная форма тиамин — дисульфид тиаминдифосфата (ТДФ-SS-ТДФ) — не проявляла каталитической активности [6]. С другой стороны, было установлено, что при физиологических условиях в присутствии восстановителей ТДФ-SS-ТДФ легко переходит в каталитически активную, циклическую форму [8]. Дисульфидная форма тиамин и его дифосфата была обнаружена в тканях животных, моче, крови (оттекающей от перфузируемой тиамин печени), в дрожжах и другом биологическом материале [8–10]. Ученые пришли к выводу, что окисленные производные тиамин, такие как дисульфид и тиохром, присутствуют во всех живых клетках и являются естественными метаболитами живого организма. Пик этих исследований приходится на 1950–1970 гг., и результаты их убедительно свидетельствуют, что дисульфидные производные тиамин, обладая более липофильными свойствами по сравнению со свободным тиамин, легче преодолевают гематоэнцефалический барьер. Сравнительное изучение механизмов транспорта тиамин и его дисульфидов через биологические мембраны показало более быстрое всасывание дисульфидных форм тиамин и подтвердило физиологичность взаимопревращения тиольной и циклической форм тиамин в тканях [10–17]. Результаты этих исследований легли в основу идеи применения дисульфидных производных тиамин в фармацевтической практике.

До недавнего времени считалось, что в тканях животных окисленные формы производных тиамин образуются в небольшом количестве и являются резервной формой витамина. Согласно данным А. Я. Розанова, раскрытие тиазолиевого кольца тиамин в тканях животных является также первым этапом и его распада, далее при определенных условиях он может необратимо метаболизироваться до цистеина и 2-метил-4-амино-метилпиримидина [9, 17], а цистеин — до сульфата.

К сожалению, сведения об образовании, обмене и роли окисленных производных ти-

мина в тканях живых организмов довольно ограничены. Большинство публикаций относятся к изучению окислительно-восстановительных свойств тиамин и его производных в условиях *in vitro*. Впервые сверхнакопление дисульфидов ТДФ в крови людей при критическом снижении его циклической формы было отмечено у людей, пострадавших в аварии на ЧАЭС [18]. Именно эти наблюдения побудили нас провести анализ накопленной на сегодняшний день информации по вышеописанной проблеме.

Таким образом, до настоящего времени нет четкого представления о том, имеет ли какое-либо специфическое биологическое значение способность тиамин к окислительно-восстановительным превращениям, в то время как накопленная на сегодня информация дает основания задуматься над этим вопросом.

#### **Методы, используемые при анализе продуктов окисления тиамин и его производных**

Анализируя данные, полученные ранее авторами при оценке содержания тиамин и его производных в тканях, а также при изучении реакции окисления молекулы тиамин *in vitro*, следует отметить, что определение тиохрома не вызывало трудностей, так как это соединение легко переходит из водных экстрактов в органическую фазу и при возбуждении имеет собственную флуоресценцию, характеризующуюся максимумом при 450 нм [19, 20].

Более проблематичным является определение дисульфидных форм тиамин. Так, установлено, что общее содержание тиамин и его производных в тканях, определяемое биологическими или видоизмененным тиохромным методом, значительно превосходило соответствующие величины, полученные стандартным тиохромным методом [10, 17, 20]. Как выяснилось, дисульфиды тиамин и его фосфаты, обладая после восстановления биологической активностью тиамин, не образуют тиохрома, если их предварительно не восстановить до тиамин [20]. Следовательно, для того, чтобы выявить наличие дисульфидных форм тиамин или ТДФ в биологических объектах тиохромным или энзимным методами [19], необходима предварительная обработка тканевых экстрактов восстановителями. В ряде модельных исследований и при исследовании биологических объектов этот прием был использован для определения содержания дисульфидов тиамин и ТДФ [17, 18, 21–23]. Однако, как правило, при изучении в модельных

условиях реакции окисления тиамин (и его производных), в частности реакции раскрытия тиазольевого кольца, этот прием не очень подходит из-за его трудоемкости. Поэтому были разработаны более быстрые методы, позволяющие следить за ходом реакции, такие как спектрофотометрический [22] и полярграфический [23–25]. Изучение активности тиамин и его производных полярграфическим методом позволило определить изменение электронной структуры указанных соединений при различных рН среды [24]. Авторы показали, что сдвиг потенциала каталитической волны сульфидной серы на полярограммах является качественной характеристикой образования тиольной формы этих соединений.

Некоторые авторы исследовали реакцию тиолизации тиамин вместе с субстратом, который восстанавливается в этой реакции. Например, А. И. Вовк с коллегами анализировали восстановление феррицитохрома с при рН >7,5 при взаимодействии с тиамин с образованием ферроцитохрома, который имеет характерное поглощение при 550 нм. По скорости образования ферроцитохрома авторы изучали кинетику окисления тиамин и некоторых его производных в различных условиях [26].

Для количественного определения дисульфида тиамин и его производных в фармацевтических препаратах предложен колориметрический метод [27]. Наши исследования показали, что в щелочных условиях взаимодействие тиола тиамин с реактивом на свободные SH-группы 5,5'-дитиобис-2-нитро-

бензойной кислотой (ДТБК, реактив Элмана) [28] имеет характер энзиматической реакции (рис. 1). Связывание тиола тиамин с ДТБК смещает реакцию вправо и ускоряет раскрытие тиазольевого кольца тиамин.

Количество образующейся 2-нитро-5-меркаптобензойной кислоты желтого цвета, эквивалентное количеству тиолизованного тиамин, определяется спектрофотометрически при  $\lambda = 412$  нм по коэффициенту молярной экстинкции —  $\varepsilon_{\lambda} = 1,3 \cdot 10^4$  (рис. 1). Эта реакция была использована для изучения кинетики раскрытия тиазольевого кольца [29]. Она может быть также применена для изучения влияния различных факторов на скорость раскрытия тиазольевого кольца тиамин, а при строго определенных условиях — для количественного определения тиамин в растворах.

### Окислительно-восстановительные превращения молекулы тиамин

**Современные представления.** Давно известно, что в щелочных растворах молекула тиамин способна подвергаться двухстадийной реакции раскрытия тиазольевого кольца с образованием аниона тиольной формы [30] как указано ниже на схеме.

Эта реакция приводит к образованию нестабильной формы тиамин-аниона и является примером практически полностью кооперативного отщепления двух протонов, которое сопровождается дальнейшими структурными изменениями в молекуле [2, 30]. Специалисты считают, что вышеописанное свойство, обу-

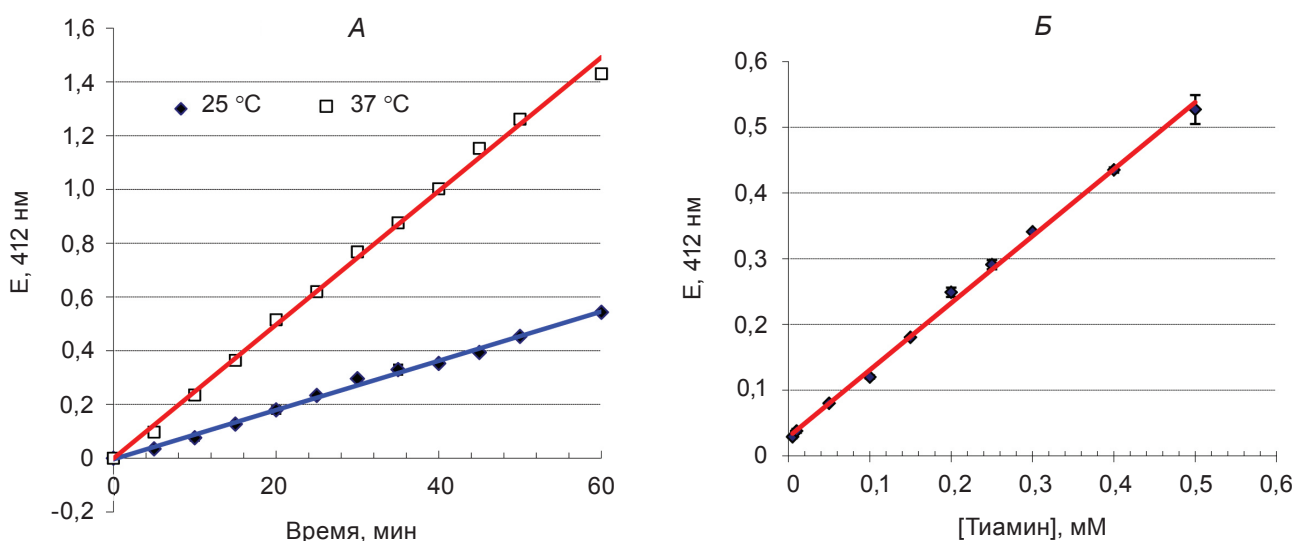


Рис. 1. Инкубация тиамин с реактивом Элмана (0,1 мМ трис-НСl буфер, рН 7,5): А — зависимость экстинкции от времени и температуры среды (концентрация тиамин — 10 мМ) и Б — от концентрации тиамин (время инкубации — 30 мин)

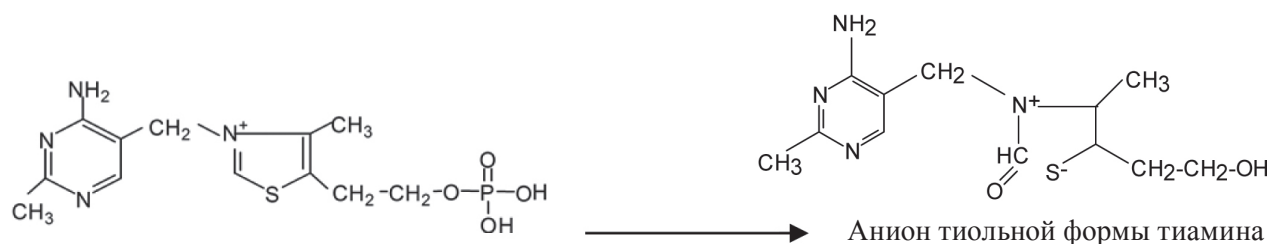


Схема образованием аниона тиольной формы [30]

словленное присутствием тиазольного кольца в тиамине, является необычным для небольшой молекулы, и оно помогло в свое время ученым установить строение молекулы тиаминна [3].

В присутствии окислителей, даже кислорода воздуха, тиольная форма тиаминна подвергается окислению с образованием дисульфида. Это обратимый процесс при наличии восстановителя. В этих же условиях, параллельно, в растворе существует и нестабильная трициклическая форма тиаминна (рис. 2), которая образует промежуточный продукт – анион тиаминна желтого цвета. Реакция далее может идти в направлении необратимого превращения молекулы нестабильной трициклической формы в стабильную циклическую форму – тioxром, соединение, имеющее собственную флуоресценцию (рис. 2).

Суть вышеуказанных структурных изменений в молекуле тиаминна заключается в том, что при раскрытии тиазольного кольца в щелочных условиях происходит слабое связывание протона С-2 тиазола с атомом азота аминокетильной группы пиридинового цикла. Это приводит к уменьшению электронной плотно-

сти на соседнем атоме углерода тиазольного кольца, к которому присоединяется отрицательно заряженный атом серы, и происходит закрытие кольца нестабильной трициклической формы. Фосфорные эфиры тиаминна при окислении в водно-щелочных растворах также образуют соответствующие флуоресцирующие производные. По интенсивности флуоресценции они образуют ряд: ТТФ < ТДФ < ТМФ < тиамин [19].

#### Изучение окислительно-восстановительных свойств молекулы тиаминна в модельных условиях

Окислительно-восстановительные превращения тиаминна изучались многими исследователями в различных направлениях. Было установлено, что дисульфид тиаминна в экспериментах *in vitro* является активным окислителем природных тиолов: цистеина, глутатиона, кофермента А, дигидролипоевой кислоты [6], при этом образуется значительное количество смешанных дисульфидов тиаминна с вышеуказанными тиолами. Поскольку в тканях животных концентрация свободных тиолов на несколько порядков выше концентрации сво-

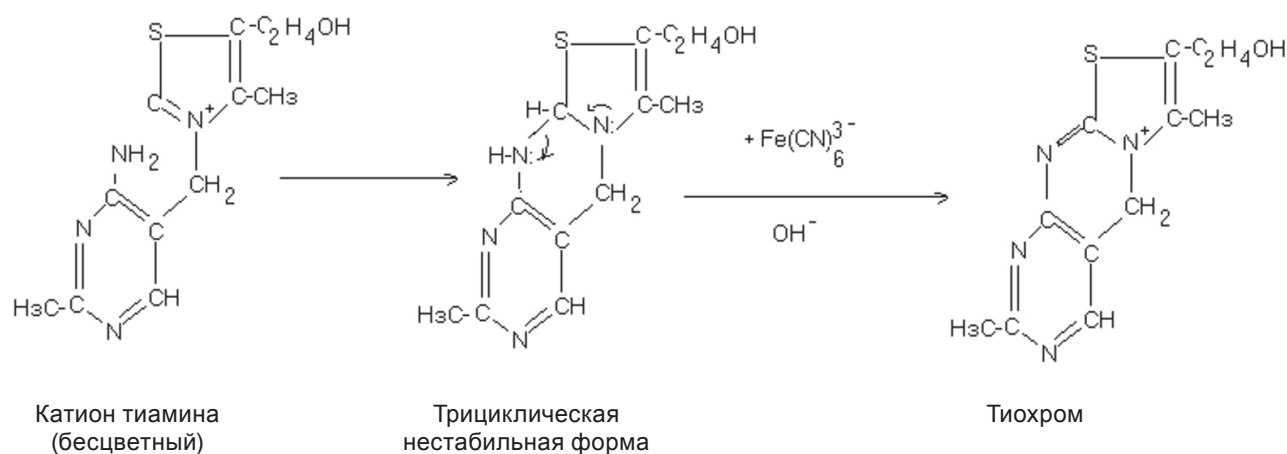


Рис. 2. Превращение тиаминна в тioxром [30]



бодного тиамин, наличие в них смешанных дисульфидов тиамин с низкомолекулярными природными тиолами вполне вероятно.

Кинетические закономерности и механизмы раскрытия тиазолиевого цикла тиамин в щелочных растворах достаточно хорошо изучены химиками [29]. Кинетические данные, полученные при йодировании продуктов раскрытия тиазолиевого кольца в буферных растворах в интервале рН от 3 до 9, показали, что общую скорость лимитирует превращение нейтрального тетраэдрического интермедиата  $T^0$ , а катализатором этой стадии могут быть общие основания и общие кислоты [31]. А. И. Бугас и Р. В. Вовк [29] на основании своих исследований пришли к заключению, что вероятный механизм раскрытия тиазолиевого кольца тиамин включает катализ общим основанием превращения нейтрального тетраэдрического интермедиата реакции.

Следует отметить, что на протяжении многих лет изучением механизмов окислительно-восстановительных превращений молекулы тиамин занимаются белорусские ученые. Первые исследования в этом направлении были проведены Ю. М. Островским, затем его ученики продолжили эти исследования. Именно ими в последние годы получены значительные результаты в понимании механизмов окислительно-восстановительной трансформации молекулы тиамин. Проведенные этими учеными квантово-химические расчеты в базе 3-21G/RHF показали, что молекула тиамин может образовывать два термодинамически устойчивых конформера, отличающихся торсионными углами вращения  $\phi$  и  $\psi$  вокруг одинарных связей метиленового мостика (рис. 3) [32].

Установлено, что для конформера I расстояние между аминогруппой в аминопирими-

диновом кольце и углеродом в C2-положении тиазольного кольца составляет 0,37 нм, а в конформере II это расстояние равно 0,54 нм. Только для конформера I возможно образование трициклической формы тиамин, способной окисляться в тиохром. Вероятно, наличие в щелочном растворе двух конформеров – I и II определяет параллельно протекающее превращение тиамин под действием окислителей в тиохром и его дисульфид.

Как следует из вышесказанного, в щелочной среде тиамин легко окисляется в тиохром и тиаминдисульфид. В качестве окислителей тиамин могут быть использованы перманганат калия, бромциан, феррицианид калия, пероксид водорода, двуокись селена, молекулярный йод. Небольшое количество тиохрома образуется в щелочных водных растворах под действием кислорода воздуха [23]. Снижение диэлектрической постоянной в растворах тиамин при его окислении увеличивает выход тиохрома. При низких значениях диэлектрической проницаемости затруднено образование тиольной формы тиамин и ионизированных форм, в то же время образуются трициклические формы, быстро окисляющиеся в тиохром. При воздействии феррицианида наибольшее количество тиохрома образуется в сильно щелочной среде (рН > 12,0). В этих условиях желтая тиольная форма находится в равновесии с трициклической формой тиамин (рис. 2). В интервале рН от 10 до 12 преобладает образование другого продукта окисления – тиаминдисульфида. Если постепенно повышать рН раствора тиамин до 11,0–11,5 или дать раствору тиамин постоять при рН 11,0–11,5 в течение нескольких минут и затем добавить окислитель, то практически весь тиамин окисляется до дисульфида без заметного образования тиохрома [23, 33]. Дисульфид

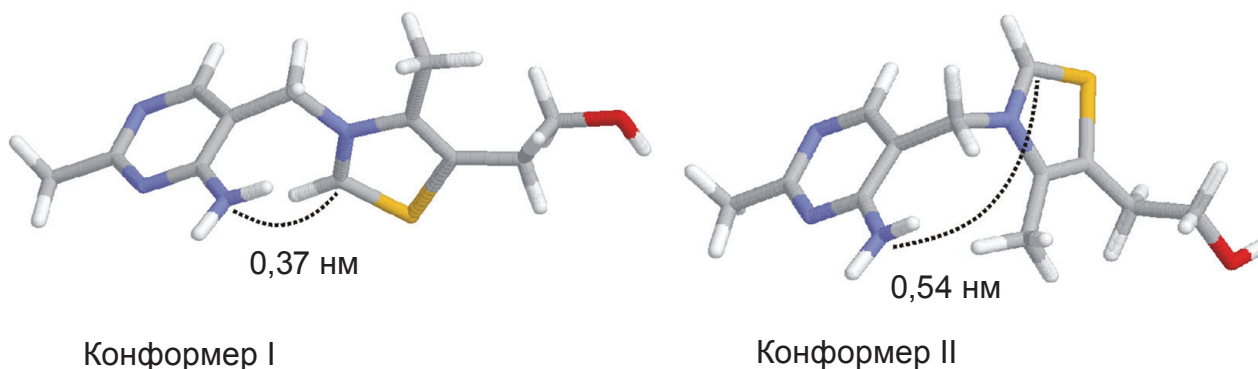


Рис. 3. Структура конформеров тиамин. Атомы азота обозначены голубым, атом серы – желтым и кислород – красным цветом [32]

тиамина и тиохром не претерпевают дальнейших превращений под действием феррицианида и некоторых других окислителей. Однако при использовании пероксинитрита тиохром не является конечным продуктом окисления тиамина. Под действием протонированной формы пероксинитрита тиохром окисляется до оксидигидротиохрома (рис. 4), который затем под действием пероксинитрита превращается в продукты, поглощающие свет при 295 нм [34]. Тиохром также может окисляться до оксидигидротиохрома под действием диоксида азота, гидроксильных радикалов, пероксильных радикалов [34, 35].

Структура оксидигидротиохрома доказана методами ЯМР, ИК и абсорбционной спектроскопии. Молекулярная масса оксидигидротиохрома (278 Да) определена методом масс-спектрологии [36]. В кислой среде он трансформируется в оксотиамин (рис. 5).

Последняя реакция, скорее всего, может протекать только в не физиологических условиях. В физиологических же условиях при воздействии неблагоприятных факторов внешней среды, сопровождающихся окислительным стрессом, генерацией активных форм азота и кислорода, наблюдается усиление трансформации трициклической и тиольной форм тиамина в дисульфид тиамина и образование циклических продуктов окисления тиамина – тиохрома и оксидигидротиохрома. Диок-

сид азота и пероксильные радикалы окисляют тиамин с образованием оксидигидротиохрома и тиаминдисульфида [34, 37].

Гидроксильные радикалы, которые образуются в реакции Фентона, а также при диссоциации протонированной формы пероксинитрита, окисляют тиамин до тиамин-тиазолона. Карбонилсодержащие продукты окислительной трансформации тиамина способны связываться с аминокеттогруппами и сульфгидрильными группами протеинов и ферментов с образованием оснований Шиффа и полумеркапталей соответственно, вызывая модуляцию активности ферментов и функции протеинов [34, 38].

#### Влияние экзогенных и эндогенных факторов на окислительную трансформацию тиамина *in vitro* и *in vivo*

**Ультрафиолетовое и рентгеновское излучение.** Все имеющиеся в литературе сведения однозначно свидетельствуют о высокой чувствительности тиамина к действию ионизирующего излучения, независимо от того, что подвергается облучению: раствор витамина [39], витаминизированный пищевой продукт [40, 41] или живая ткань [42, 43].

Исследователи подчеркивают более высокую чувствительность тиамина к ультрафиолетовым лучам и радиации по сравнению с другими витаминами. Например, воздействие ионизирующей радиации в общей дозе 3 бэра

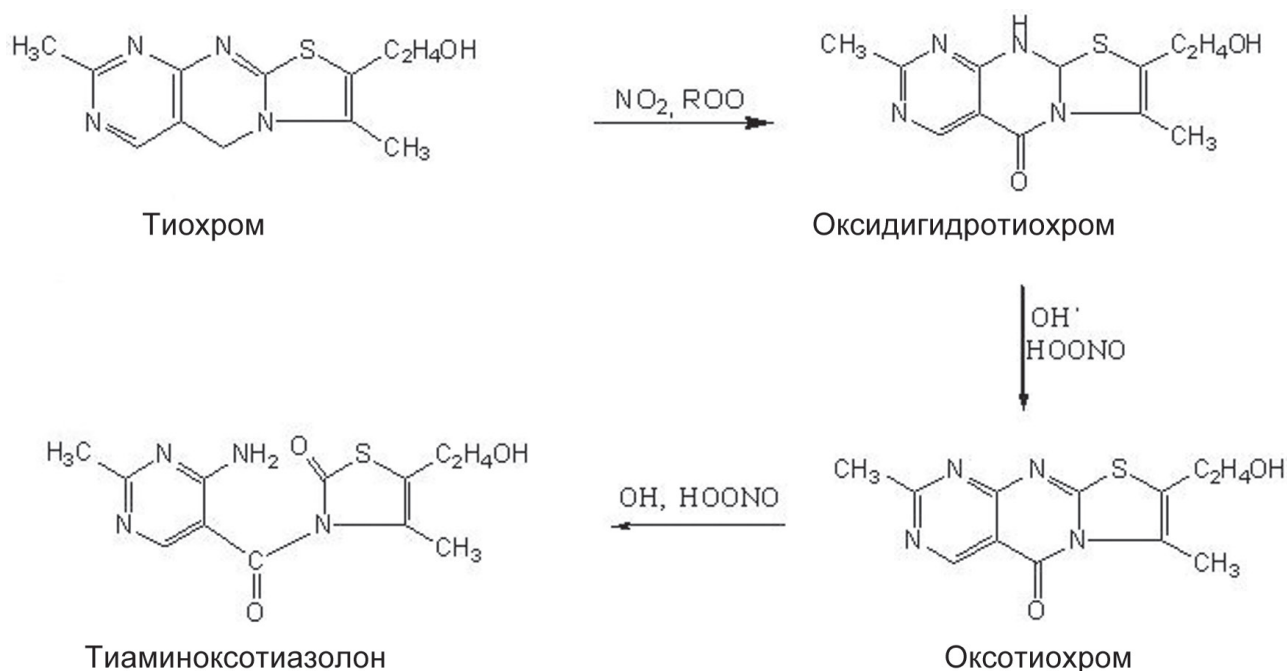


Рис. 4. Схема окисления тиохрома под действием диоксида азота, пероксильных радикалов, гидроксильных радикалов, протонированной формы пероксинитрита [35]

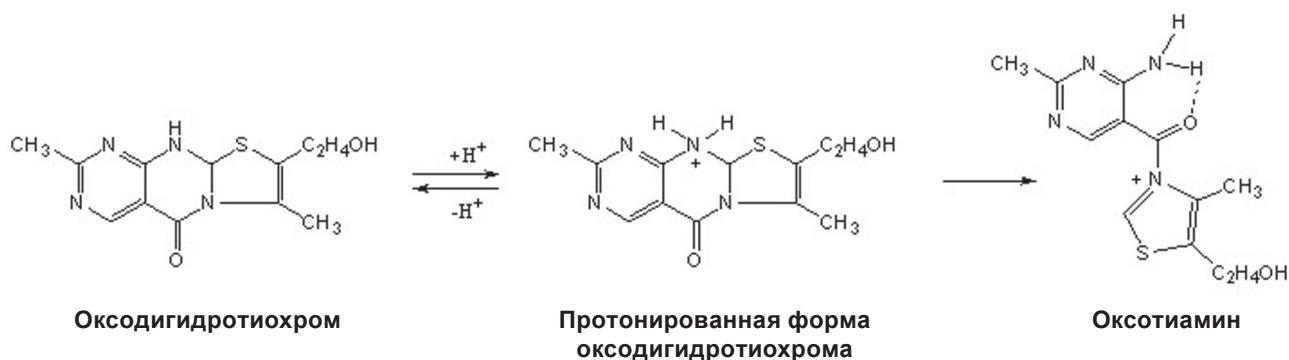


Рис. 5. Предполагаемая схема образования оксотиамина в кислой среде [35]

(3 биологических эквивалента рентгена) на витамины, смешанные с говяжьим фаршем, приводило к разрушению тиаминa на 60–67%, рибофлавина (витамина В<sub>2</sub>) – на 8–10%, пиридоксина (витамина В<sub>6</sub>) – на 24–25%; никотиновая, фолиевая кислоты и холин при этих условиях не разрушались [39]. Другие исследователи отмечали, что при облучении мясных продуктов деструкция тиаминa достигает 70–95%, причем значительная часть тиаминa в этом случае расщеплялась до пиримидинового и тиазольевого компонентов [40], которые не только не восстанавливаются в организме человека и животного до целой молекулы, но и могут оказывать непредсказуемое действие на нервную систему [44]. Известно, что симптомы лучевой болезни (рвота, тошнота, головные боли, кишечные и нервные расстройства), развивающиеся при терапевтических дозах рентгеновских лучей, полностью устраняются введением 6 мг тиаминa (орально) на фоне богатой углеводами пищи за 2 дня до начала облучения [41]. Вышеприведенные данные свидетельствуют о том, что некоторые из перечисленных симптомов лучевой болезни могут быть связаны со значительным снижением тиаминa в организме. М. М. Кубарева [45] также сообщила о том, что тотальное облучение кроликов большими дозами рентгеновских лучей (800 Р) снижало содержание тиаминa в их крови (с 14 до 2 мкг, %) и моче (с 136 до 56 мкг). Наибольший эффект наблюдался через двое суток после облучения. Витаминизация животных *per os* до и после облучения при дозе тиаминa 0,83 мг на 1 кг облегчала течение лучевой болезни и увеличивала выживаемость животных. Интересно, что такого эффекта не наблюдали при подкожном введении тиаминa. О том, что причиной снижения уровня тиаминa в тканях под влиянием облучения организма является его окисление, свидетельствуют

более поздние наблюдения J. V. Fox et al. [46], которые показали, что потеря тиаминa в тканях животного при  $\gamma$ -облучении находится в обратной зависимости от восстанавливающей способности ткани. Современные исследования в области питания также подтверждают вывод относительно частичного разрушения тиаминa при стерилизации продуктов ионизирующим облучением [47].

Долгое время механизмы разрушения молекулы тиаминa под действием ионизирующего облучения не исследовались и не анализировались. Обратиться к этой проблеме нас вынуждают данные, полученные впервые украинскими учеными при определении содержания активной формы тиаминa (ТДФ) в крови людей, пострадавших от аварии на ЧАЭС. Оказалось, что в крови этих людей доля ТДФ в форме ТДФ-SS-ТДФ значительно возрастает, и, вместе с тем, критически снижается содержание циклической (биологически активной) формы ТДФ. Последняя практически отсутствовала в крови людей с диагнозом «острая лучевая болезнь», и эти изменения в статусе тиаминa сопровождались существенными нарушениями в функции нервной системы [18]. В крови таких больных ТДФ вообще не определялся без предварительной обработки проб восстанавливающим агентом, а суммарное содержание ТДФ + ТДФ-SS-ТДФ превышало такой же показатель в крови здоровых людей за счет возрастания доли ТДФ-SS-ТДФ, в ряде случаев значительно. При анализе массива данных, полученных при обследовании людей, в документах которых была зафиксирована полученная доза, отмечена тенденция прямой зависимости долевого содержания ТДФ-SS-ТДФ в общем пуле ТДФ + ТДФ-SS-ТДФ от полученной дозы облучения.

Таким образом, многочисленные исследования убедительно свидетельствуют о том, что

ультрафиолетовое, рентгеновское, радиоактивное облучение ускоряют разрушение тиамин в организме путем окислительной трансформации его молекулы и этот процесс сопряжен с защитой других биологически важных структур от негативного действия. В частности, в работе [48] сообщается о том, что высокие дозы тиамин могут предупреждать негативное влияние рентгеновского облучения на генетический аппарат клетки.

#### **Взаимодействие тиамин с полифенолами.**

Присутствие антиаминовых соединений в растительных материалах известно с 1946 года [49]. Некоторые из них были идентифицированы как фенолы и флавоноиды, общим в структуре которых было наличие полигидроксильных групп в бензеновом кольце [50–52]. Somogyi и др. [52, 53] исследовали взаимодействие между тиамин и кофейной кислотой, а также другими фенольными соединениями, и пришли к заключению, что полифенольные соединения, имеющие ортогидроксильные группы оказывают выраженный антиаминовый эффект, в то время как фенолы с пара- и мета-гидроксильными заместителями — средний эффект или никакого. Davis J. и Somogyi J. [54] сообщали, что реакция между тиамин и 3,4-дигидроксициннамовой (кофейной) кислотой является бифазной и может быть частично обращена добавлением цистеина. Согласно данным Murgata и др. [55], кофейная кислота и катехол разрушают тиазолиевый фрагмент тиамин с образованием 2-мети-4-амино-5-амино-метилпиримидина. Vimokesant и др. [56–58] сообщали об эффекте потребления чая или жевания ферментированных листьев чая на статус тиамин у тайландцев. Длительное употребление чая вместо воды у этих людей приводило к развитию дефицита тиамин, о чем свидетельствовало значительное повышение транскетолазной активности в их крови при определении ее при добавлении экзогенного ТДФ по сравнению с той же активностью, определяемой без ТДФ (разница в активности — «ТДФ-эффект»). Этот показатель приходил в норму при добавлении тиамин при питье или при отказе от жевания ферментированных листьев чая и бетеля. Оба растения — и чай, и бетель являются источниками танновой кислоты, которая присутствует не только в них, но и во многих фруктах и овощах, потребляемых человеком в различных частях света [57]. Судя по тому, что стабильные формы окисленного тиамин — Na-соль тиола тиамин и тиаминдисульфид не разлагаются пирокатехинами [59], фенолы

взаимодействуют с нестабильными формами тиамин, о которых говорилось выше — анионном тиола тиамин или его нестабильной трициклической формой. Реакция ингибируется цистеином и аскорбиновой кислотой [60], в продуктах реакции найдены: 2-метил-4-амино-5-оксиметилпиримидин, 4-метил-5-окси-этилтиазол и продукты их окисления.

Таким образом, к ряду окислительно-восстановительных превращений тиамин относятся также реакции его взаимодействия с полифенолами, такими как кофейная и дубильная кислоты, некоторые флавоны, катехоламин, гидрохинон, пирогаллол, гемин и другие. Эти реакции приводят к разложению тиамин при pH 7,0 *in vitro* и, согласно работам [55, 61], ответственны за инактивацию тиамин в организме людей, потребляющих продукты питания, обогащенные биологическими полифенолами [54, 59, 60, 62]. Исследование механизма взаимодействия тиамин с «антиаминовыми» соединениями полифенолового типа показало, что реакции имеют псевдопервый порядок и их температурная зависимость подчиняется уравнению Аррениуса. Гидроксильные ионы, как уже говорилось выше, способствуют раскрытию тиазолиевого кольца тиамин с образованием сульфгидрильных производных, которые находятся в равновесии с тиамин. Ионизация и окисление полифенолов кислородом воздуха (или некоторыми другими окислителями) приводит к образованию форм, которые могут быть представлены хинонами или другими подобными соединениями. Быстрое каталитическое окисление тиамин хинонами приводит к образованию тиаминдисульфида из тиольной формы, сдвигая равновесие реакции в сторону, противоположную от циклической формы тиамин [63].

По-видимому, таков же характер начальных стадий взаимодействия тиамин с ароматическими аминокислотами протеинов. В этом случае реакция не доходит до окисления тиамин, а ограничивается переводением его тиазолиевого компонента в каталитически активную илидную форму, образующуюся и при реализации функции ТДФ как коэнзима [2, 30]. Об этом свидетельствуют результаты исследования Ishide T. и др. [64], которые в модельных экспериментах показали наличие выраженного взаимодействия тиазолиевого кольца с индолом (моделирующим триптофановый остаток протеина).

Свои представления о сопряжении процессов окислительно-восстановительных превращений фенолов и тиамин при изменении



pH среды Vimokesant S. с соавт. [57] представили в виде схемы (рис. 6).

Данные А. И. Степура с соавт. также свидетельствуют, что свободные радикалы тирозина [65] или свободные радикалы других монофенольных соединений [35] окисляют тиольную и трициклическую формы тиамина до тиаминдисульфида и тиохрома соответственно. Фенольные соединения эффективно взаимодействуют с пероксильными и гидроксильными радикалами, пероксинитритом, диоксидом азота с образованием свободных феноксильных радикалов, которые окисляют тиамин до тиаминдисульфида и тиохрома [35, 65, 66].

**Взаимодействие тиамина с оксиферрильными формами гемопротеинов.** В аспекте выяснения механизмов образования окисленных производных тиамина в организме животных и человека целесообразно проанализировать возможность наличия в их тканях феноксильных радикалов. А. И. Степура с соавт. считают [65], что важным источником феноксильных радикалов в организме могут быть реакции взаимодействия фенольных соединений с пероксидазами, каталазами и оксиферрильными формами гемопротеинов. Согласно существующей гипотезе, фенольные соединения проникают в гемовый карман и восстанавливают

оксиферрильные формы гемопротеинов в соответствующие ферри-формы, а сами образуют феноксильные радикалы [35, 65, 67].

Между ферри-формой гемосодержащего протеина (например, миоглобина) и пероксидом водорода в результате двухэлектронного окисления образуется оксиферрильная форма гемопротеина (соединение I или  $^+\text{Mb}(\text{IV}=\text{O})$ ), с радикалом на порфирине, а также оксиферрильный комплекс гема  $\text{Fe}(\text{IV}=\text{O})$  и молекула воды (рис. 7). Оксиферрильная форма гемопротеина (рис. 7), например миоглобина с радикалом  $^+\text{Mb}(\text{IV}=\text{O})$ , вследствие внутримолекулярного переноса заряда может трансформироваться в оксиферрильную форму  $\text{Mb}(\text{IV}=\text{O})^*$ , содержащую долгоживущие тирозильные радикалы (остатки тирозина 103) стабильные в течение нескольких часов [68, 69].

Для тиамина в трициклической форме стерически невозможно или сильно затруднено непосредственное взаимодействие с ионом железа или порфириновым радикалом в гемовом кармане оксиферрильной формы миоглобина. В гемовый карман проникает только тиольная форма тиамина, которая окисляется в дисульфид тиамина, и восстанавливает оксиферрильный комплекс  $\text{Fe}(\text{IV}=\text{O})$  в ферри-катион,  $\text{Fe}(\text{III})$ . Свободные радикалы, образующиеся на аминокислотных остатках

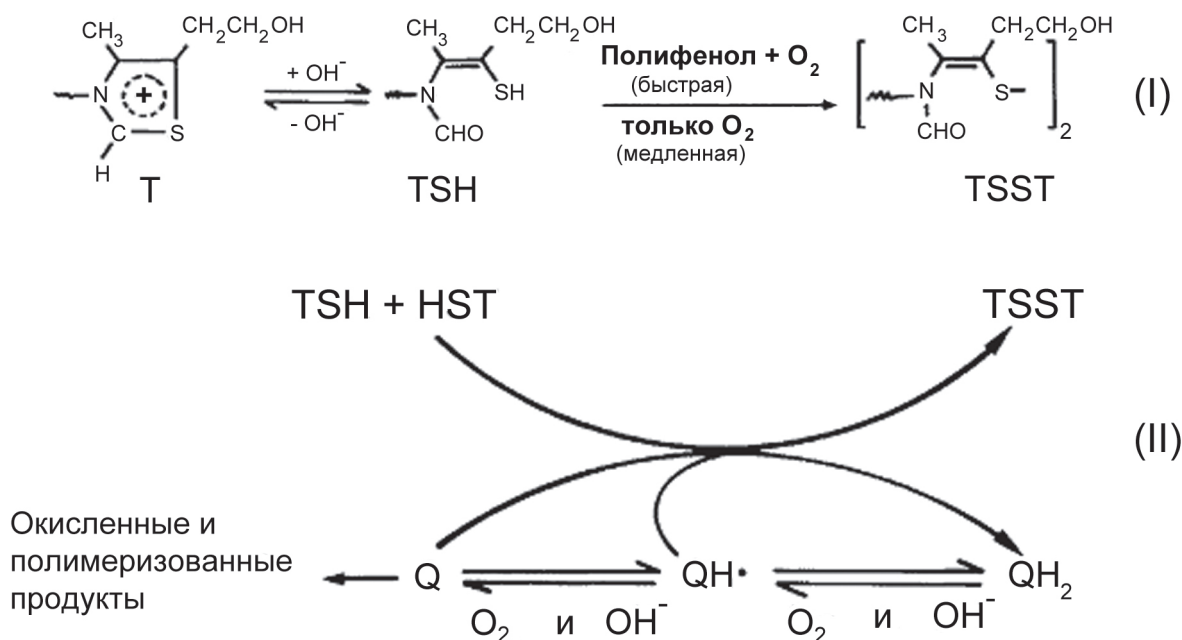


Рис. 6. Схема, показывающая: I – эффект pH или  $[\text{OH}^-]$  на раскрытие тиазольного кольца тиамина (T) до тиольной формы (TSH) и ионизацию полифенолов ( $\text{QH}_2$ ) и II – эффект кислорода на окисление полифенолов до хинонов (Q) и образование тиаминдисульфида (TSST) из раскрытой формы (TSH) [57]

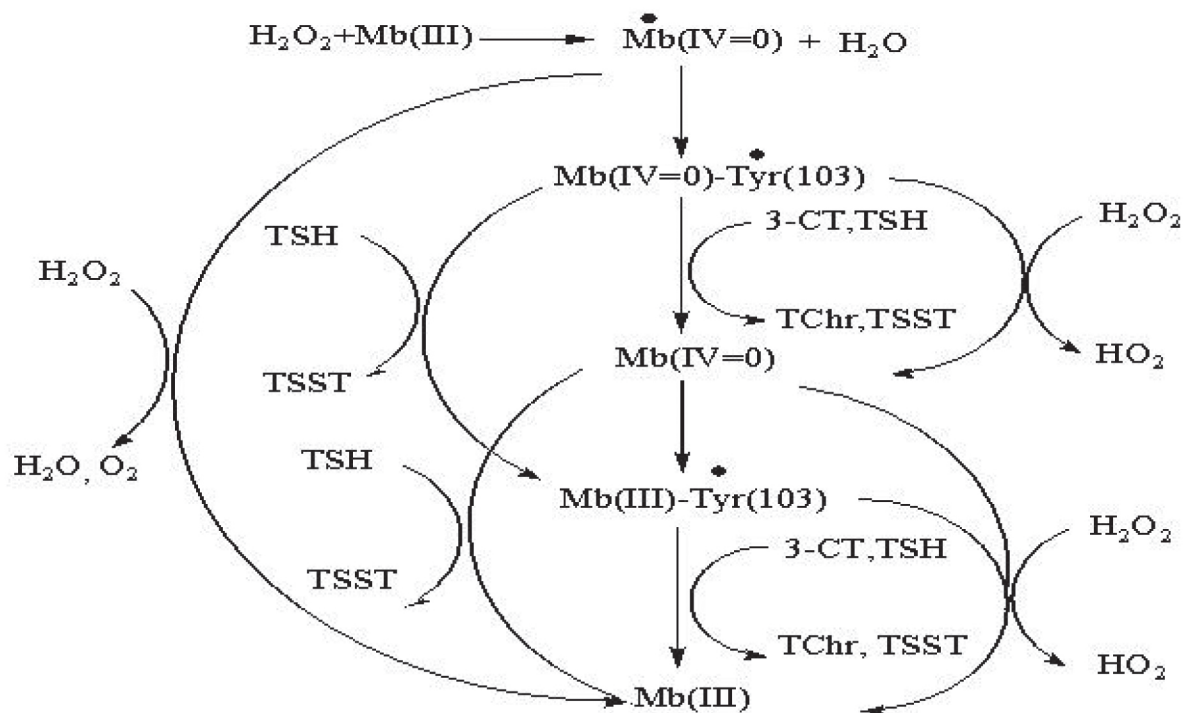
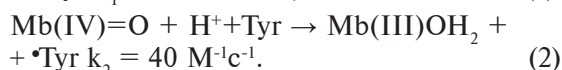
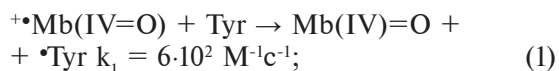


Рис. 7. Схема окисления тиамина под действием оксоферрильной формы миоглобина [35, 38]. Принятые сокращения:  $^+ \text{Mb(IV=O)}$  – оксоферрильная форма миоглобина с радикалом на порфирине или соединении I,  $\text{Mb(IV=O)-Tyr(103)}$  – оксоферрильная форма миоглобина с радикалом на остатках тирозина, оксоферрильная  $\text{Mb(IV)=O}$  или соединение II,  $\text{Mb(III)}$  – ферри-форма миоглобина, (3-CT) – трициклическая форма тиамина, (TSH) – тиольная форма тиамина, (TSST) – дисульфид тиамина, (TChr) – тиохром

протеиновой глобулы, более доступны для молекул тиамина и окисляют как тиольную, так и трициклическую форму тиамина. Тиохром образуется только вследствие взаимодействия трициклической формы тиамина с тирозиновыми радикалами, локализованными на протеиновой глобуле (рис. 7). Подобные реакции характерны и для оксоферрильных форм других гемопротеинов.

Показано [70], что в системе: ферри-форма метгемоглобина человека – пероксидаза (1.11.1.7) (из хрена или коровьего молока) в присутствии пероксида водорода тиамин окисляется до тиохрома и тиаминдисульфида. В системе с каталазой (1.11.1.6) тиамин окисляется с образованием тиохрома и тиаминдисульфида только в присутствии трет-бутилгидропероксида или других органических пероксидов, но не пероксида водорода. Цитохром *c* из сердца лошади в присутствии пероксида водорода не только окисляет тиамин до тиохрома, но также эффективно (в отличие от других гемопротеинов) окисляет тиохром до оксидигидроотиохрома [35]. По сравнению с циклической формой тиамина, тирозин, фе-

нол, парацетамол, салициловая кислота легко проникают в гемовый карман. Таким образом, в присутствии монофенольных соединений протекают последовательно реакции одно-электронного восстановления оксоферрильной формы гемопротеина: протеин- $^+ \text{Fe(IV=O)}$  до протеин- $\text{Fe(IV=O)}$ , а затем протеин- $\text{Fe(III)}$ . В результате этих реакций фенольные соединения образуют феноксильные радикалы. Например, для оксоферрильных форм миоглобина и тирозина эти реакции можно представить следующим образом [67]:



Образовавшиеся свободные радикалы тирозина окисляют трициклическую и тиольную формы тиамина (рис. 8, 9).

Авторы этого обзора показали, что сопряженное пероксидазное окисление тиамина и замещенных фенолов характеризуется разнонаправленным действием различных фенолов на окисление тиамина и его производных.

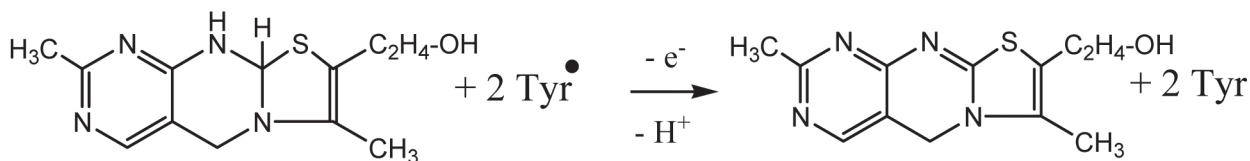


Рис. 8. Окисление трициклической формы тиамин в тиохром тирозильными радикалами [38, 65]

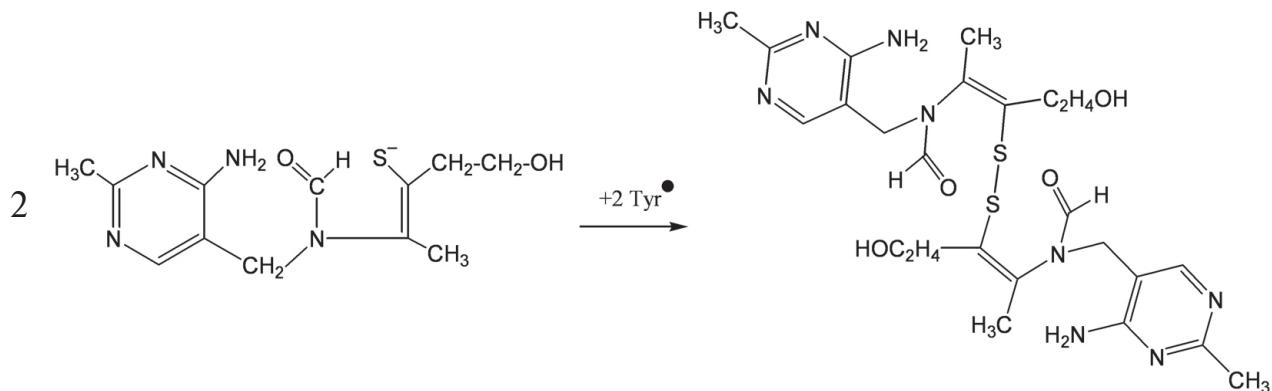


Рис. 9. Окисление тиольной формы тиамин тирозильными радикалами в тиаминдисульфид [38, 65]

Пероксидазное окисление тиамин-фенолов пар в одном случае характеризуется быстрым ростом скорости окисления тиамин, а в другом имеет четко выраженное ингибирование окисления тиамин (табл. 1). Так, наблюдали активацию пероксидазного окисления тиамин для пар тиамин-фенол, тиамин-тирозин, тиамин-тирамин, тиамин-салициловая кислота, тиамин-парацетамол. Фенол, тирозин, тирамин на 1–2 порядка увеличивают выход продуктов окисления тиамин и его фосфорных эфиров под действием оксоферрильных форм миоглобина или оксоферрильных форм гемоглобина, а также каталазы и пероксидаз. В последнем случае происходит регенерация свободных радикалов фенола и других монофенольных соединений, таких как тирамин, парацетамол, за счет окисления тиамин и его производных. Кверцетин, ДОФА, биофлавоноиды, напротив, полностью ингибируют окисление тиамин в тиохром.

Резкое снижение выхода тиохрома в присутствии кверцетина, рутина, ДОФА и биофлавоноидов отражает, во-первых, их большую реакционную способность при взаимодействии с оксоферрильным комплексом гема, чем у монофенолов и, следовательно, быстрое восстановление оксоферрильных гемопротеинов в ферри-формы. Во-вторых, известно, что свободные радикалы кверцетина и биофлавоноидов не способны окислять трициклическую форму тиамин в тиохром, а окисляют только

тиольную форму тиамин в дисульфид тиамин [57].

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что при окислительном стрессе, когда резко возрастает уровень активных форм кислорода и увеличивается содержание оксоферрильных форм гемопротеинов, фенол, тирозин, парацетамол, салициловая кислота активируют катаболизм тиамин, окисляя его в тиохром и тиаминдисульфид. Тиохром, как уже говорилось выше [71], в отличие от тиаминдисульфида, не способен восстанавливаться в организме до тиамин. Следовательно, при длительном применении ацетаминофена или салициловой кислоты необходимо дополнительное поступление в организм тиамин или производных тиамин как для снижения токсического действия свободных радикалов ацетаминофена, так и для ускорения разрушения пероксидов водорода и возмещения концентрации тиамин, окисленного в тиохром [71].

#### Окисленные производные тиамин в тканях животных и возможное биологическое значение способности тиамин к окислительно-восстановительным превращениям

Хотя химическая реакция образования тиола тиамин и его фосфатов в опытах *in vitro* хорошо изучена [6, 29, 72], сведения об условиях образования окисленных производ-

Таблица 1. Выход тиохрома после инкубации тиамин с метгемоглобином, пероксидом водорода в присутствии и в отсутствие фенольных соединений. Концентрация метгемоглобина 1 мкМ, концентрация тиамин, фенольных соединений и пероксида водорода 1 мМ. Смесь (метНв + тиамин + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) обозначена А [70]

№ п/п	Состав раствора	Значение рН	Выход Тх, мкМ	
			20 мин инкубации	40 мин инкубации
1	А=(метНв + тиамин+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	7,30	0,22	0,35
2	А + ацетилсалициловая кислота	6,78	0,63	0,92
3	А + салициловая кислота	6,50	1,20	1,56
4	А +D-тирозин	6,82	4,30	5,80
5	А + тирамин	7,31	3,70	4,80
6	А + фенол	7,27	6,70	8,10
12	А + дофамин	7,00	0,04	0,05
13	А + кверцетин	7,00	0,05	0,06

ных тиамин в физиологических условиях, их содержание в тканях и роль в биохимических процессах достаточно ограничены. Согласно немногочисленным исследованиям, из окисленных производных тиамин в биологических объектах были обнаружены дисульфидные формы тиамин и тиаминдифосфата (ТДФ), тиохром [3, 9, 17]. К сожалению, систематический анализ содержания этих производных в тканях животных не был проведен. Сообщалось о том, что в говядине и свинине около 40% от общего содержания тиамин [9] обнаружено в форме тиаминдисульфида, однако окисление тиамин могло произойти уже при хранении мяса. После введения животным высоких доз тиамин, С. А. Петров с соавт. [73] обнаружили накопление в тканях значительных количеств тиохрома. Как уже сообщалось выше, значительное накопление дисульфида ТДФ наблюдалось в крови людей, пострадавших от радиоактивного облучения [18]. Дисульфидные формы тиамин обнаружены в луковичных растениях [3], описано обра-

зование их в организме животных из тиамин под влиянием аллицина чеснока [9].

Биологическое значение способности тиамин к окислительно-восстановительным превращениям до сих пор остается окончательно не выясненным. Теоретический анализ этой способности тиамин был проведен в работе [74] еще в 1974 году. Для того, чтобы понять естественный отбор тиазолового гетероцикла как активной части тиамин, авторы провели исследование химических свойств тиазолиевых ионов и сравнили их со свойствами других азолиевых соединений – оксазолия и имидазолия. Они сравнили способность этих ионов к образованию илидов, раскрытию кольца, и их каталитическую активность. В основе такого сравнительного исследования лежит убеждение авторов в том, что для успешного функционирования указанных гетероциклов как биохимических катализаторов важна не только их способность осуществлять каталитическую реакцию, но и способность к быстрому взаимопереходу из закрытой формы в открытую в

Таблица 2. Эффект гетероатомов на величину lg константы скорости образования илида и открытия кольца [74]

Гетероцикл	Гетероатом	Логарифм соответствия константы скорости	
		Образования илида	Открытия кольца
Оксазолия	O	5,5	8,9
Тиазолия	S	3,5	4,6
Имидазолия	N	0	0



физиологических условиях. Именно последнее свойство, по их мнению, обеспечивает эффективность транспортировки и обмена витамина В<sub>1</sub> в условиях *in vivo*. Результаты сравнения скорости образования илидов и раскрытия гетероцикла для азолиевых соединений приведены в табл. 2 [74].

Установлено, что оксазолы в 100 раз быстрее, чем тиазолы образует илид, и в то же время он абсолютно не эффективен в катализе, в модельных экспериментах *in vivo*, или в опытах *in vitro* [75]. Причиной этого является кинетическая и термодинамическая нестабильность его при физиологических значениях рН. Имидазолиевый ион, наоборот, частично способен заменить тиазолиевый в каталитической реакции, однако он практически не образует илида, то есть он «слишком» стабилен при физиологических условиях, что делает его плохим заместителем тиазолия. Таким образом, из ряда азолиевых соединений только ион тиазолия удовлетворяет условиям, необходимым для участия в каталитической реакции окислительного декарбоксилирования  $\alpha$ -кетокислот, так как при физиологических значениях рН скорость раскрытия его кольца и скорость каталитической реакции сравнимы. Авторы предположили, что это свойство обуславливает участие молекулы тиамин и его биологически активных производных не только в реакциях катализа, но и в биологических реакциях тиол-дисульфидного обмена, которые играют центральную роль в системах защиты организма животных и людей от деструктивного действия неблагоприятных факторов окружающей среды. Вместе с этим, было высказано и теоретически обосновано предположение, что именно способность к быстрому взаимопереходу из закрытой формы тиазолия в открытую обеспечивает эффективность транспортировки и обмена тиамин в клетках, и что образование тиольной формы тиамин является одной из обязательных звеньев на пути реализации его биохимических функций. Действительно, работы многих исследователей свидетельствуют о том, что связывание тиамин через S-S связи с протеинами крови является важным фактором для его транспортировки в организме [75].

На протяжении нескольких десятилетий изучения биохимии тиамин ученые периодически возвращались к поиску биохимических реакций, в которых его окислительно-восстановительные свойства могут иметь специфическое значение. Так, А. А. Титаев [76] при изучении механизма торможения тиамин

реакции окисления полифенолов, обнаружил, что в присутствии окисленного адреналина происходит окисление тиамин в тиохром. Он предположил, что сыворотка крови и экстракты из гипофиза и щитовидной железы содержат некий «катализатор», возможно, энзимной природы, резко ускоряющий окисление тиамин в присутствии адреналина. Согласно его гипотезе, окисление тиамин в присутствии адреналина и сыворотки совершается в две фазы: 1-я фаза – окисление адреналина и 2-я фаза – окисление тиамин с одновременным восстановлением окисленного адреналина. Этот механизм вполне соответствует схеме, приведенной на рис 6. Ответить на вопрос, имеет ли какое-либо специфическое значение в организме реакция взаимодействия тиамин с адреналином, пока что невозможно. Однако, при введении в организм высоких доз тиамин этот эффект, по-видимому, может иметь место.

Такой же вопрос возникает при анализе результатов, полученных А. Н. Разумович и Г. А. Доста [11], которые изучали возможную взаимосвязь между образованием тиаминдисульфида и функционированием дыхательной цепи митохондрий. Авторы предположили, что в тканях животных восстановление тиаминдисульфида в свободный тиамин может происходить при участии дыхательной цепи митохондрий на уровне системы цитохромов, предположительно на уровне цитохрома *c*. Сделано заключение, что если это и имеет место, то взаимодействие цитохромов с ТДФ-SS-ТДФ не является строго специфичным, если принимать во внимание известные данные о том, что дыхательная цепь вообще не специфична к какому-то одному или нескольким донорам, или акцепторам электронов, а может окислять или восстанавливать любые вещества, имеющие окислительно-восстановительный потенциал, соизмеримый с таковым для отдельных переносчиков дыхательной цепи.

Более поздние работы белорусских биохимиков позволили получить новую информацию относительно взаимосвязи окислительно-восстановительных превращений тиамин и цитохрома. Они показали, что благодаря реакциям пероксидазного окисления ряда монофенольных соединений (таких как парацетамол, салициловая кислота, тирозин), сопряженных с окислением тиамин до тиохрома, обеспечивается восстановление неактивной оксоферрильной формы цитохрома *c* до активного феррицитохрома, который снова может участвовать в транспорте электронов [35, 71]. Тиохром далее под действием новой молекулы  $^+\bullet\text{Cyt } c$  (IV=O)

окисляется до катион-радикала тиохрома, который после присоединения гидроксильного радикала образует оксодигидро тиохром). Оксоферрильная форма Cyt c  $^{+}Fe(IV=O)$  в этом случае также восстанавливается до ферри-цитохрома.

Полученные результаты позволили авторам предположить, что пероксидазное окисление тиамин, сопряженное с окислением монофенольных соединений, может быть фактором, препятствующим накоплению токсичной оксоферрильной формы Cyt c  $^{+}Fe(IV=O)$  и способствовать элиминации  $H_2O_2$  в межмембранном пространстве митохондрий. Эти данные подтверждаются данными Yoo Jeong-Sook H. и др. [77], которые свидетельствуют о влиянии обеспеченности организма тиамином на функционирование цитохрома P-450, принимающего участие в детоксикации ксенобиотиков.

Была также установлена связь между образованием окисленных производных тиамин и обменом оксида азота [23]. Так, тиольная форма тиамин высвобождает оксид азота из S-нитрозоглутатиона, в процессе этой реакции образуются дисульфид тиамин, смешанный дисульфид тиамин с глутатионом и оксид азота. С другой стороны, диоксид азота, генерируемый ферриформами миоглобина и гемоглобина в присутствии нитрита и  $H_2O_2$ , может способствовать окислению тиольной формы тиамин до тиаминдисульфида и трициклической — до тиохрома, далее — до оксодигидро тиохрома [38]. Эти исследования проведены *in vitro* и концентрации ингредиентов в реакциях не всегда соответствуют физиологическим. Однако полученные результаты и анализ данных литературы дает авторам основания предполагать, что тиамин и его гидрофобный метаболит — тиохром, при определенных условиях могут выполнять важную антиоксидантную функцию в защите клеточных структур от повреждающего действия пероксинитрита, диоксида азота, пероксида.

Следует заключить, что способность молекулы тиамин к тиолизации (раскрытию тиазолиевого кольца), по-видимому, является одним из необходимых условий его обмена в клетках, а для ТДФ — одним из этапов в реализации его функции как катализатора. Хотя этот процесс обратимый, при наличии окислителей, каковыми в живых клетках могут быть, например, феноксильные радикалы, тиольная форма тиамин легко окисляется до дисульфида или тиохрома, и в результате часть тиамин выключается из обмена. Специаль-

ных энзимов, катализирующих окисление тиамин по указанному пути, в тканях животных не обнаружено.

Таким образом, присутствие окисленных метаболитов тиамин и его фосфатов в клетках животных, пусть даже и в минорных количествах, является установленным фактом, а, следовательно, нельзя исключать возможность их регуляторного влияния, опосредованного специфическим взаимодействием этих соединений с клеточными структурами или протеинами. В этом аспекте заслуживают внимания работы С. А. Петрова, свидетельствующие о способности тиохрома принимать участие в регуляции активности некоторых энзимов [78, 79].

#### **Прикладные аспекты использования окислительно-восстановительных способностей тиамин и его дисульфидных производных**

**Решение аналитических вопросов.** Способность молекулы тиамин в щелочных условиях подвергаться тиолизации и окисляться до тиохрома (в присутствии окислителей) уже давно используется в аналитических целях. Так, разработано несколько модификаций высокочувствительного количественного метода определения тиамин, принцип которого заключается в окислении тиамин до тиохрома и извлечении последнего в органическую фазу [17, 80]. Количество образующегося тиохрома анализируется по его флуоресценции, которая измеряется при длинах волн 360–375 нм возбуждающего и 420–440 нм излучаемого света [19]. Оказалось также, что способность молекулы тиамин к тиолизации в щелочных условиях может быть использована для создания колориметрического метода определения тиамин и ТДФ с использованием реактивов на SH-группы. На рис. 1 показан ход реакции взаимодействия тиамин с реактивом Элмана.

Способность молекулы тиамин в определенных условиях окисляться до тиохрома используется исследователями для анализа других соединений. Например, предложен фотохимический метод определения пестицида метамидофоса, основанный на быстром его разрушении в присутствии пероксидсульфата при УФ-облучении. Фосфат в фотохимическом процессе реагирует с молибдатом натрия в разбавленной азотной кислоте с образованием фосфомолибденовой кислоты, которая окисляет тиамин до тиохрома [81]. По такому же принципу разработан флуориметрический метод для количественного определения арса-

ниловой кислоты [82]. Оригинальным является метод определения SH-групп протеинов и низкомолекулярных тиолов с помощью дисульфидов тиамин, принцип которого заключается в определении количества SH-групп по количеству свободного тиамин (определяется тиохромным методом), который образуется в реакции между реагирующими соединениями (тиол и дисульфид тиамин) при переходе от нейтрального до слабощелочного pH [83].

**Использование дисульфидных производных тиамин в создании лекарственных препаратов.** Интерес к дисульфидным производным тиамин как возможным его лекарственным формам возрос в связи с работами, в которых было показано, что эти витаминные препараты как более липофильные лучше всасываются из желудочно-кишечного тракта и лучше депонируются, чем тиаминхлорид или тиаминбромид [11–14].

Дисульфидные производные тиамин, легче преодолевающие гематоэнцефалический барьер, были предложены для использования в фармацевтической практике наряду с тиаминхлоридом и тиаминбромидом. При лечении ряда патологий они оказались даже более эффективными, чем сам тиамин. В настоящее время выпускается несколько препаратов, основу которых составляют дисульфидные производные тиамин, некоторые из них приведены в табл. 3.

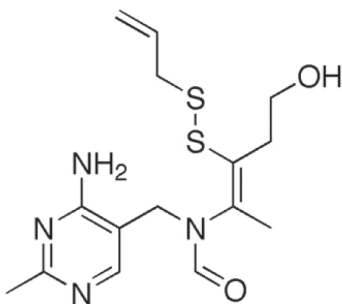
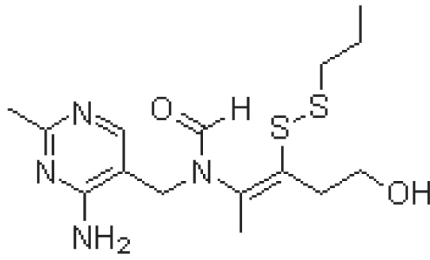
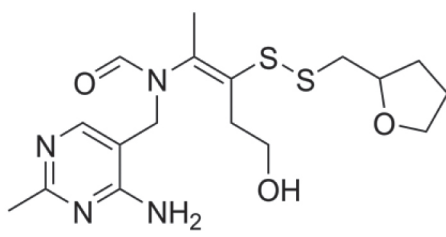
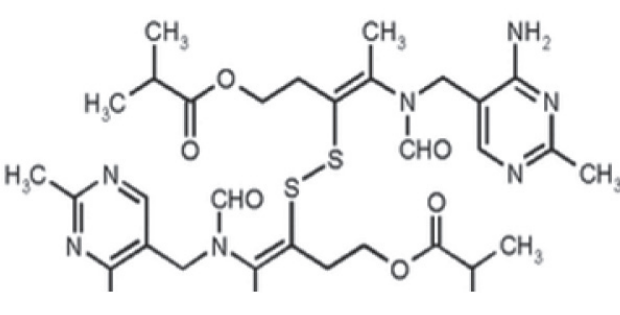
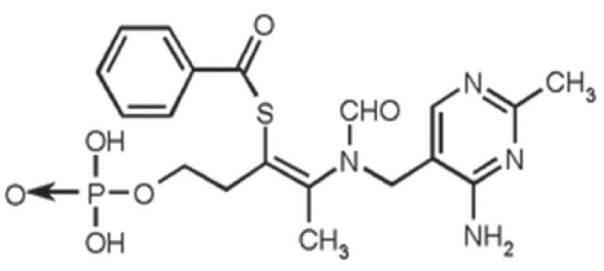
У авторов, проводящих исследование эффективности этих препаратов, не вызывают сомнения преимущества большинства из них перед тиаминхлоридом (или бромидом) при лечении дефицита тиамин (бери-бери) и других заболеваний, в лечении которых эффективность тиамин твердо установлена. Что касается заявленных новых свойств этих препаратов [88], то этот вопрос находится на стадии исследования и не является окончательно решенным. Широкое использование в качестве фармацевтического препарата получил бенфотиамин, однако и его эффективность при лечении ряда патологий окончательно не доказана. Так, на животных с моделью диабета продемонстрирована способность бенфотиамин ускорять регенерацию тканей поврежденных конечностей [89], а также предотвращать кардиодисфункцию за счет активации сигнальных механизмов выживания [90].

Интересные наблюдения получены в предварительных экспериментах по использованию препарата просултиамин в лечении вирусных инфекций [91]. Так, авторы исследовали возможность использования этого пре-

парата в лечении заболевания, вызванного человеческим лимфоцитарным вирусом типа HTLV-I. Сначала авторы проверили эффективность препарата в опытах *in vitro* на клеточной линии HTLV-T-лимфоцитов (НСТ-1), полученной от инфицированных пациентов. Исследования показали, что просултиамин вызывает каспазозависимый апоптоз CD4 (+) T-клеток периферической крови пациентов, инфицированных вирусом, и существенное уменьшение количества провирусных копий HTLV-I. Далее шести больным, инфицированным вирусом HTLV-I, внутривенно в течение 14 дней вводили просултиамин. В результате количество копий провируса HTLV-I в периферической крови уменьшились приблизительно на 30–50% от их уровня до начала лечения с некоторыми клиническими улучшениями у всех пациентов.

Угнетающее действие дисульфидной формы тиамин на патогенные вирусы было показано *in vitro* и на ВИЧ [92]. Авторы исследовали несколько тиольных и дитиольных соединений (TSST-тиаминдисульфид, липоевая кислота и N-ацетилцистеин) как анти-ВИЧ препараты против опосредованной трансактиватором (Tat) трансактивации ВИЧ-1 (HIV-1). Все исследованные соединения значительно снижали ВИЧ-1-Tat активность, но из них только TSST проявлял заметное анти-ВИЧ-Tat действие, ингибируя продукцию прогена HIV-1 при остром и хроническом HIV-инфицировании СЕМ клеток в нетоксических концентрациях (500–1000 мкМ). В концентрации 500 мкМ TSST блокировал образование HIV-1 на 99,7% после 96 часов культивирования при остром HIV-1 (культура LAV-1), в то время как в хронически инфицированных клетках (СЕМ/LAV-1 и др.) ингибирование составляло 90–98%. Таким образом, исследования показали, что TSST может быть эффективным в химиотерапии СПИДА. Продолжая исследования, эти же авторы провели детальное изучение действия о,о'-бисмиристил тиамин дисульфида (БМТД) на несколько клеточных линий, инфицированных вирусом HIV-1 *in vitro* [93]. Они показали, что БМТД ингибирует ядерную транслокацию HIV-1 трансактиватора (Tat) и клеточного транскрипционного ядерного фактора-КВ (NF-κB), что приводит к подавлению репликации HIV-1. Детальный механизм взаимодействия БМТД с молекулами HIV-1-tat и фактора-КВ, а также насколько эффективным окажется это соединение в лечении ВИЧ-инфекции в организме человека, предстоит еще выяснить.

Таблица 3. Дисульфидные производные тиамина – перспективные как лекарственные препараты

	<p><b>Аллитиамин</b>, природное дисульфидное производное тиамина, впервые выделено из чеснока [84]</p>
	<p><b>Тиамин пропил дисульфид (ТПД), Просултиамин</b>, другие названия товарных марок фармацевтических препаратов, которые выпускаются на его основе: Prosultiamin, Alinamin, Binova, Jubedel, Taketron, Thiobeta, Thiotiamina. Синтезирован в Японии в 1950 году, предложен для лечения В<sub>1</sub>-дефицита [85]</p>
	<p><b>Тиамин тетрагидрофурфурил дисульфид</b>, название товарных марок фармацевтических препаратов на его основе : Fuzultiamin (<b>Фурзултиамин</b>) Adventan, Alinamin-F, Benlipoid, Beviton Lipophil, J [86]</p>
	<p><b>Дисульфид изобутирил</b> тиамина, синонимы: <b>Сулбутиамин</b> (Sulbutiamine), Argalion. Димер двух модифицированных молекул тиамина, синтезирован в Японии. Предложен для лечения синдрома хронической усталости [87]</p>
	<p><b>S-бензоил тиамин O-монофосфат</b>, выпускается как <b>Бенфотиамин</b> (Benfotiamine). Сначала был предложен как пищевая добавка, сейчас рекомендуется к использованию при диабетической ретинопатии, невропатии, нефропатии. Эффект до конца не изучен [88]</p>



Лидерами в исследовании дисульфидных производных тиамин являются японские исследователи. Они же предложили использовать гликозилированный дисульфид тиамин в качестве активного переносчика для доставки в мозг лекарственных препаратов (в частности, напроксена) [94].

Обобщая приведенный в данной статье материал, можно заключить, что окисленные производные тиамин и его фосфатов (в основном, их дисульфидные и тиохромные формы), как правило, образуются и присутствуют в живых клетках, хотя не похоже, что их образование является результатом функционирования специфических энзимов. Полученные данные (*in vivo* и *in vitro*) говорят о том, что тиольная форма тиамин, образование которой является одним из обязательных звеньев на пути реализации биохимических функций тиамин, в том числе и как кофермента, также как и нестабильная циклическая форма тиамин, могут вступать в непосредственное взаимодействие со свободными радикалами различного происхождения, которые накапливаются в организме при неблагоприятных условиях. Это могут быть свободные радикалы, образующиеся на аминокислотных остатках протеиновых глобул, например, оксоферрильные формы гемопротеинов, феноксильные радикалы, пероксинитрит, диоксид азота.

Однако, говоря о том, что тиольная или трициклическая форма тиамин окисляется при взаимодействии с такими-то молекулами, мы, естественно, имеем ввиду, что молекула-партнер при этом восстанавливается и, следовательно, в этих реакциях тиамин выступает как достаточно сильный антиоксидант. И это свойство тиамин может быть важным для живого организма, по-видимому, потому что окислительно-восстановительный потенциал молекулы тиамин соизмерим с таковым для многих природных соединений.

И все же вопрос о возможной специфической роли окислительно-восстановительных превращений молекулы тиамин в реализации его биологических функций в организме до сих пор остается открытым. Высокая эффективность дисульфидных производных тиамин в качестве лекарственных препаратов по сравнению с его циклической формой подтверждает высказанное ранее предположение Duglose J. [74] о том, что способность молекулы тиамин к быстрому обратимому переходу в окисленную форму играет существенную роль в его транспортировке через биологические мембраны и, соответственно, в его био-

доступности. Заслуживает внимания гипотеза А. И. Степура с соавт. [65] о взаимодействии тиамин с оксоферрильными формами гемопротеинов, образование которых в тканях возрастает в условиях оксидативного стресса различного происхождения. Возможно, именно в этом направлении следует искать объяснение сверхнакопления дисульфида ТДФ в тканях организма, после радиоактивного облучения. Показанная многими авторами высокая реакционная способность молекулы тиамин в присутствии окислителей взаимодействовать с природными соединениями, имеющими фенольные структуры в молекуле (такие как адреналин, цитохром *c*, аминокислоты и др.), свидетельствует о том, что такие реакции могут иметь место и в живом организме. Однако концентрация свободного тиамин при этом должна быть достаточно высокой, что достигается только при инъекционном введении тиамин или при перентеральном введении его липофильных производных, таких как бенфотиамин и др.[95].

*Работа над обзором проводилась в рамках беларуско-украинского сотрудничества при поддержке Беларускаго фонда фундаментальных исследований (грант № Б11К-081) и Фонда фундаментальных исследований Украины (грант Ф 41.4/023).*

## ОКИСЛЕНІ ПОХІДНІ ТІАМІНУ: УТВОРЕННЯ, ВЛАСТИВОСТІ, БІОЛОГІЧНА РОЛЬ

Ю. М. Пархоменко<sup>1</sup>, І. І. Степура<sup>2</sup>,  
Г. В. Донченко<sup>1</sup>, В. І. Степура<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна  
НАН України, Київ;

e-mail: yupark@biochem.kiev.ua;

<sup>2</sup>Інститут біоорганічної хімії

НАН Білорусі, Гродно;

e-mail: biophyz@biochem.unibel.by;

<sup>3</sup>Гродненський держуніверситет

ім. Янки Купали, Білорусь;

e-mail: vstepuro@grsu.by

В огляді вперше наведено узагальнення й аналіз наявних в літературі відомостей про утворення, властивості, можливу біологічну роль і практичне застосування окислених похідних вітаміну В<sub>1</sub> (тіаміну). Відомо, що при значеннях рН > 7,0 молекула тіаміну здатна вступати в двостадійну реакцію розкриття тіазолієвого кільця з утворенням аніона тіольної форми тіаміну і нестабільної трициклическої форми. За наявності окисників у лужному середовищі

тіольна форма окислюється в тіаміндисульфід, трициклічна – в тіохром. Окислювальній трансформації молекули тіаміну сприяють феноксильні радикали, рівень яких у тканинах тварин може істотно підвищуватися під час стресу різного походження, коли різко зростає рівень активних форм кисню і вміст оксоферильних форм гемопротейнів. На підставі даних літератури можна припустити, що тіамін і його гідрофобний метаболіт – тіохром – за певних умов виконує важливу антиоксидантну функцію захисту клітинних структур від ушкоджуючої дії пероксинітриду, діоксиду азоту, пероксиду. Присутність окислених метаболітів тіаміну і його фосфатів в клітинах тварин, нехай навіть і в незначній кількості, є встановленим фактом, а отже не можна виключати можливості їх регуляторного впливу на клітинні процеси, опосередкованого специфічною взаємодією цих сполук із клітинними структурами або протеїнами.

**Ключевые слова:** тіамін, тіаміндисульфід, дисульфід тіаміндифосфату, тіольна і трициклічна форми тіаміну, тіохром, феноксильні радикали, оксоферильні форми гемопротейнів.

#### OXIDIZED DERIVATIVES OF THIAMINE: FORMATION, PROPERTIES, BIOLOGICAL ROLE

*Yu. M. Parkhomenko<sup>1</sup>, I. I. Stepuro<sup>2</sup>, G. V. Donchenko<sup>1</sup>, V. I. Stsiapura<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: yupark@biochem.kiev.ua;

<sup>2</sup>Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Grodno; e-mail: biophys@biochem.unibel.by;

<sup>3</sup>Yanka Kupala University of Grodno, Belarus; e-mail: vstepuro@grsu.by

#### Summary

The data available in literature about formation, properties, possible biological role and practical application of the oxidized derivatives of B<sub>1</sub> vitamin (thiamine) is first generalized and analysed in the review. It is known that at the values of pH > 7.0 the molecule of thiamine is able to undergo two-phase reaction of opening of thiazole ring with formation of anion of thiol form of thiamine and unstable tricyclic form. In the presence of oxidants in an alkaline environment a thiol form of thiamine is oxidized to thiamine disulfide, tricyclic form – to thiochrome. Oxidative transformation of thiamine molecule is promoted by phenoxyl

radicals, their level can be substantially increased in animal tissues at oxidizing stress of different origin when the level of reactive forms of oxygen sharply increases and content of hemoproteins oxoferryl forms is raised. The analysis of literature data gives grounds to assume that thiamine and its hydrophobic metabolite – thiochrome – under certain conditions can perform an important antioxidant function in protection of cell structures against damaging action of peroxynitrite, nitrogen dioxide, peroxide. The presence of oxidized metabolites of thiamine and its phosphates in the cells of animals, even in minor quantities, is an established fact and, consequently, there is a possibility, that they can interact specifically with cellular structures or proteins to effect cellular processes in certain conditions.

**Key words:** thiamine, thiamine disulfide, disulfide of thiamine diphosphate, thiol and tricyclic forms of thiamine, thiochrome, phenoxyl radicals, hemoproteins oxoferryl forms.

1. *Островский Ю. М.* Тиамин: Избранные главы по биохимии витамина B<sub>1</sub>. – Минск: Беларусь, 1971. – 144 с.
2. *Pullman B., Spanjaard C.* // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1961. – **46**, N 3. – P. 576–580.
3. *Robinson B.* The vitamin B complex. – London: Chapman & Hall LFD, 1951. – 456 p.
4. *Zima O., Ritsert K., Moll Th.* // *Hoppe-Sezler's Zeitschrift fur phziologische chemie.* – 1941. – **267**, N 1. – P. 210–227.
5. *Matsuda T., Yurygi S.* // *Pros. Japan. Acad.* – 1952. – **28**, N 1. – P. 146–151.
6. *Гриневиц В. П.* Взаимодействие дисульфидных производных тиамина с биологически активными природными тиолами и дисульфидами. Автореф. дис.... канд. биол. наук. – Минск, 1976. – 18 с.
7. *Розанов А. Я.* // *Биохимия.* – 1962. – **27**, № 4. – С. 641–650.
8. *De Renco E. C., Oleson J. J., Hutchings B. L., Williams J. H.* // *J. Nutr.* – 1954. – **54**, N 1. – P. 133–14.
9. *Розанов А. Я.* / В кн. Тиамин: Обмен, механизм действия / Ред. проф. А. А. Титаев. – М.: Наука, 1978. – С. 27–84.
10. *Itada N.* // *J. Vitaminol (Kyoto).* – 1959. – **5**, N 1. – P. 61–65.
11. *Разумович А. Н., Доста Г. А.* // *Биохимия.* – 1963. – **28**, N 3. – С. 439–444.
12. *Fujita D., Mushika Y.* // *Vitaminol.* – 1966. – **12**, N 1. – P. 18–23; 24–23.
13. *Greenwood J., Pratt O. E.* // *J. Physiol.* – 1985. – **369**, N 1. – P. 79–91.

14. *Кругликова-Львова Р. П.* / В кн. Тиамин: обмен, механизм действия / Ред. проф. А. А. Титаев. – М.: Наука, 1978. – С. 134–141.
15. *Ikeda K., Itokawa Y., Fujiwara N.* // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1971. – **249**, N 2. – P. 373–379.
16. *Kawasaki C.* // *Vitam. Norm.* – 1963. – **21**, N 1. – P. 69–106.
17. *Розанов А. Я.* Метаболизм тиамина, его фосфорных эфиров и дисульфидов в животном организме. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Одесса, 1963. – 30 с.
18. *Пархоменко Ю. М., Черныш И. Ю., Протасова З. С., Донченко Г. В.* // ДАН Украины. – 1995. – Вып. 2. – С. 112–114.
19. *Островский Ю. М.* Тиамин / В кн.: Эксперим. витаминол. / Ред. Ю. М. Островский. – Минск: Наука и техника, 1979. – С. 176–223.
20. *Бубешко Н. Н., Степура В. И., Степура И. И.* // Журн. прикл. спектроскопии. – 2011. – **78**, № 3. – С. 354–360.
21. *Пархоменко Ю. М., Черныш И. Ю., Донченко Г. В.* // Вісн. морс. медицини. – 2011. – № 3. – С. 94–96.
22. *Vonvicino G. E., Hennessy D. J.* // *Int. Z. Vitaminforsch.* – 1959. – **30**, N 1. – С. 83–111.
23. *Степура А. И., Пилецкая Т. П., Степура И. И.* // Биохимия. – 2005. – **70**, N 3. – С. 416–429.
24. *Мосолов Н. Н., Островский Ю. М., Шелленбергер А.* // Биоорганич. химия. – 1977. – **3**, № 5. – С. 646–653.
25. *Мосолов Н. Н., Степура И. И., Островский Ю. М.* // Биохимия. – 1972. – **37**, № 6. – С. 1265–1275.
26. *Вовк А. И., Бабий Л. В., Муравьева И. В.* // Журн. общей химии. – 2002. – **72**, № 11. – С. 1913–1917.
27. *Krishnan M. V., Mahajan S. N., Rao G. R.* // *Analyt.* – 1976. – **101**, N 1205. – P. 601–610.
28. *Sedlak J., Lindsay R. H.* // *Anal. Biochem.* – 1968. – **25**, N 1. – С. 192–205.
29. *Бугас Р. В., Вовк А. И.* // Журн. орган. фармацевт. хімії. – 2008. – **2**, № 2. – С. 71–77.
30. *Metzler D.* / In: *The Enzyme* (Beyer P. D., Lardy H., Myrback K., eds.), 2nd ed. – New York: Academic Press, 1960. – P. 295–337.
31. *Washabaugh M. W., Gold M. A., Yang C. C.* // *J. Am. Chem. Soc.* – 1995. – **117**, N 29. – P. 7657–7664.
32. *Stepuro I. I., Stsiapura V. I.* / 11th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules. Book of abstracts. – Aschaffenburg, Germany, 2005. – P. 250IS.
33. *Risinger G., Parker P.* // *Cell. Mol. Life Sciences (CMLS).* – 1965. – **21**, N 6. – P. 305–305.
34. *Stepuro I. I.* // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* – 2005. – **72**, N 1. – P. 115–127.
35. *Stsiapura V. I., Stepuro I. I.* // In *Handbook of Free Radicals: Formation, Types and Effects* / Eds. D. Kozyrev, V. Slutsky. – Nova Science Publishers, 2010. – P. 319–376.
36. *Stepuro I. I.* // *Vopr. Med. Khim.* – 1992. – **38**, N 4. – P. 26–33.
37. *Oparin D.* // *Chem. Nat. Compounds.* – 1985. – **21**, N 5. – P. 688–689.
38. *Степура И. И., Опарин А. Ю., Степура В. И. и др.* // Биохимия. – 2012. – **77**, вып. 1. – С. 53–70.
39. *Калмыков П. Е., Егизаров Т. М.* // Воен. мед. журн. – 1955. – № 7. – С. 35–48.
40. *Alexander H. D., Day T. J., Sauberlich H. E., Salmon W. D.* // *Fed. Proc.* – 1956. – **15**, N 3. – P. 921–923.
41. *Ziporin Z. Z., Kraybill H. F., Thach H. J.* // *J. Nutrition.* – 1957. – **6**, N 2. – P. 201–210.
42. *Савицкий И. В., Лейс Н. Ф.* // Радиобиол. – 1966. – **6**, № 6. – С. 807–811.
43. *Kawasaki Ch., Daira J.* // *Vitamins.* – 1962. – **26**, N 6. – P. 462–466.
44. *Филлипова Л. Б.* Распространение в нейроструктурах головного мозга и обмен в организме тиамина и гемонейрина: Автореф. дис.... канд. биол. наук. – Киев, 1979. – 18 с.
45. *Кубарева М. М.* // *Вопр. питания.* – 1962. – **21**, № 1. – С. 76–80.
46. *Fox J. B., Lakritz L., Thayer D. W.* // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1993. – **64**, N 3. – P. 305–309.
47. *Hozová B., Takásová M.* // *Nahrung.* – 1993. – **37**, N 4. – P. 345–351.
48. *Konopačka M., Rogolinski J.* // *Acta Biochem. Polonica.* – 2004. – **51**, N 3. – P. 839–843.
49. *Weswig P. H., Freed A. M., Haao J. R.* // *J. Biol. Chem.* – 1946. – **165**, N 4. – P. 737–743.
50. *Beruter J., Somogui J. C.* // *Esperientia.* – 1967. – **23**, N 12. – P. 996–1004.
51. *Hilker D. M.* // *Intern. Z. Vitaminforsch.* – 1968. – **38**, N 3. – P. 387–391.
52. *Somogyi J. C., Bonicke R.* // *Intern. Z. Vitaminforsch.* – 1969. – **39**, N 1. – P. 65–73.
53. *Somogyi J. C.* // *J. Vitainol.* – 1971. – **17**, N 3. – P. 165–174.
54. *Davis J. S., Somogyi J. C.* // *Intern. Z. Vitaminforsch.* – 1969. – **39**, N 4. – P. 401–406.
55. *Murata K., Tanaka R., Yamaoka M.* // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* – 1974. – **20**, N 2. – P. 351–366.
56. *Vimokesant S. L., Hilker D. M., Nakornchai S. et al.* // *Amer. J. Clin. Nutr.* – 1975. – **28**, N 12. – P. 1458–1463.
57. *Vimokesant A., Kunjara A., Rungruangsak K. et al.* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1982. – **378**, N 1. – P. 123–136.



58. *Rungruangsak K., Tosukhowong P., Panijpan B., Vimokesani S. L.* // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1977. – **30**, N 10. – P. 1680–1685.
59. *Fumico H., Kiku M.* // *Vitamins.* – 1981. – **55**, N 7. – P. 293–303.
60. *Ruenwongsa P., Pattanavibag S.* // *Nutr. Repta. Int.* – 1983. – **27**, N 4. – P. 713–721.
61. *Dhinyo P., Somrudee Ch.* // *Int. J. Vitaminol. Nutr. Res.* – 1981. – **51**, N 4. – P. 380–384.
62. *Hayakawa F., Urabe K., Hilker D., Murata K.* // *Ibid.* – 1986. – **56**, N 1. – P. 65–72.
63. *Panijan Bhinyo, Ratanawubolchai Kreawan* // *Ibid.* – 1980. – **50**, N 3. – P. 247–253.
64. *Ishide T., Matsui M., Inoe M. et al.* // *Biochem. Biophys. Res. Com.* – 1983. – **116**, N 2. – P. 486–491.
65. *Стенуро А. И., Адамчук Р. И., Опарин А. Ю., Стенуро И. И.* // *Биохимия.* – 2008. – **73**, № 9. – С. 1281–1293.
66. *Бурлакова Е. Б., Храпова Н. Г.* // *Усп. химии.* – 1985. – **LIV**, № 9. – С. 1540–1558.
67. *Herold S.* // *Free Radic. Biol. Med.* – 2004. – **36**, N 6. – P. 565–579.
68. *Svistunenko D. A., Patel R. P., Voloshchenko S. V., Wilson M. T.* // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**, N 11. – P. 7114–7121.
69. *Gunter M. R.* // *Free Radic. Biol. Med.* – 2004. – **34**, N 12. – P. 1345–1354.
70. *Стенуро И. И., Стенуро В. И.* / В кн. Окислительная трансформация тиамин и его производных гемопротеинами по пероксидазному механизму, катализируемая фенол-содержащими соединениями / ред. Солодков А. П., Чиркин А. А. – Витебск, 2010. – С. 28–58.
71. *Лабор С. А., Опарин А. Ю., Стенуро В. И. и др.* // *Матер. Междунар. научн. конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем».* – Минск, Беларусь, 2012. – С. 50–55.
72. *Бабій Л. В.* Модельні окислювальні перетворення тіаміну і тіамін фосфатів. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – К., 2002. – 20 с.
73. *Петров С. А., Федорко Н. Л., Семерюкова І. А.* // *Укр. биохим. журн.* – 1991. – **63**, № 3. – С. 109–113.
74. *Duglose J. M., Hoake T.* // *Biochem.* – 1974. – **13**, N 26. – P. 53–58.
75. *Рыбина А. А., Халмуратов А. Г., Пархоменко Ю. М.* // *Укр. биохим. журн.* – 1980. – **52**, № 5. – С. 652–667.
76. *Тумаев А. А.* // *Биохимия.* – 1948. – **13**, № 3. – С. 197–206.
77. *Yoo Jeong-Sook H., Park Hee-Sun, Ning Shu M. et al.* // *Biochem. Pharmacol.* – 1990. – **39**, N 3. – P. 519–552.
78. *Петров С. А., Желязкова И. А.* // *Физиол. журн.* – 1991. – **37**, № 1. – С. 45–49.
79. *Петров С. А., Розанов А. Я., Гаврилюк І. В., Миськова О. Б.* // *Укр. биохим. журн.* – 1990. – **62**, № 1. – С. 102–106.
80. *Vicas P., Lypcz-García I., Bravo-Bravo M. et al.* // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – **403**, N 4. – P. 1059–1066.
81. *Perez-Ruiz T., Martinez-Lozano C., Tomas V., Martin J.* // *Talanta.* – 2001. – **54**, N 5. – P. 989–995.
82. *Perez-Ruiz T., Martinez-Lozano C., Tomas V., Martin J.* // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2002. – **372**, N 2. – P. 387–390.
83. *Keiichi Kohno* // *J. Vitaminol.* – 1966. – **12**, N 1. – P. 137–151.
84. <http://en.wikipedia.org/wiki/Allithiamine>
85. *Thomson A. D., Frank O., Baker H., Leevy C. M.* // *Ann. Intern. Medicine.* – 1971. – **74**, N 4. – P. 529–34.
86. *Lonsdale D.* // *Med. Sci. Monit.* – 2004. – **10**, N 9. – P. 199–203.
87. *Ollat H., Laurent B., Bakchine S. et al.* // *Encephale.* – 2007. – **33**, N 2. – P. 211–215.
88. *Stirban A., Negrean M., Stratmann B. et al.* // *Diabetes Care.* – 2006. – **29**, N 9. – P. 2064–2071.
89. *Gadua S., Emanuelli C., Van Linthout S. et al.* // *Diabetologia.* – 2006. – **49**, N 2. – P. 405–420.
90. *Rajesh., Katare M. D., Andrea Caporali, Atsuhiko Oikawa et al.* // *Circ. Heart Fal.* – 2010. – **3**, N 2. – P. 294–305.
91. *Nishiura Y., Nakamura T., Fukushima N. et al.* // *Antivir. Ther.* – 2009. – **14**, N 4. – P. 533–542.
92. *Shoji S., Furuishi K., Misumi S. et al.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1994. – **205**, N 1. – P. 967–975.
93. *Shoji S., Furuishi K., Ogata A. et al.* // *Ibid.* – 1998. – **249**, N 3. – P. 745–753.
94. *Wei Fan, Yong Wu, Xian-Kun Li. et al.* // *Europ. J. Med. Chem.* – 2011. – **46**, N 9. – P. 3651–366.
95. *Bitsch R., Wolf M., Moiler J. et al.* // *Ann. Nutr. Metab.* – 1991. – **35**, N 1. – P. 292–296.

Получено 13.06.2012