

УДК 577.127.3

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ТИАМИНА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ НИТРИТА И ОКСОФЕРРИЛЬНЫХ ФОРМ МИОГЛОБИНА

А.Ю. Опарин¹, Т.П. Пилецкая¹, И.И. Степура¹, В.И. Степура²,
Н.Н. Бубешко²

1 – Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси, Гродно, Беларусь

2 – Гродненский госуниверситет имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь

При взаимодействии пероксида водорода с ферри-формами миоглобина из сердца лошади формируются высокорекреационные оксоферрильные формы гемопротейна, которые окисляют тиамин и его фосфорные эфиры до тиохрома, тиаминдисульфида и их фосфатов, соответственно. Фенольные соединения, нитрит на 1-2 порядка увеличивают выход продуктов окисления тиамин и его фосфорных эфиров под действием оксоферрильных форм миоглобина или оксоферрильных форм гемоглобина. Тирозин, фенольные соединения и нитрит проникают в гемовый карман и восстанавливают оксоферрильный катион в ферри-катион. Образовавшиеся тирозильные и феноксильные радикалы окисляют тиамин до тиохрома и тиаминдисульфида. Диоксид азота окисляет тиамин и тиохром с образованием оксодигидро тиохрома. Обсуждается роль оксоферрильных форм гемопротейнов, нитрита и фенольных соединений в окислительной трансформации тиамин и его производных.

Ключевые слова: тиамин, диоксид азота, миоглобин, нитрит, перекись, тиохром, оксодигидро тиохром

Interaction of hydrogen peroxide with ferri-forms of horse myoglobin and human hemoglobin results in the formation of reactive oxoferryl forms of hemoproteins which oxidize thiamine and its phosphate esters to thiochrome, thiaminedisulfide and their phosphates respectively. Phenolic compounds and nitrite increase the yield of oxidative products of thiamine and its phosphate esters under the action of oxoferryl forms of hemoproteins by 1-2 orders. Tyrosine, phenolic compounds, and nitrite can penetrate into heme pocket and reduce oxoferryl form to ferri form. The resulting tyrosyl and phenoxyl radicals oxidize thiamine to thiochrome and thiaminedisulfide. Nitrogen dioxide oxidizes thiamine and thiochrome to produce oxodihydrothiochrome. The role of oxoferryl forms and phenolic compounds in oxidative transformation of thiamine and its derivatives is discussed.

Key words: thiamine, nitrogen dioxide, myoglobin, nitrite, peroxide, thiochrome, oxodihydrothiochrome.

Введение

Рядом исследователей показано, что при взаимодействии пероксида водорода с гемопротейнами, в том числе и с миоглобином, формируются высокорекреационные оксоферрильные формы гемопротейнов, которые окисляют биомолекулы и инициируют перекисное окисление липидов [1, 2, 3]. Пероксид водорода образуется в организме, как вследствие прямой неэнзиматической реакции дисмутации супероксидов, так и вследствие реакции, катализируемой СОД, а также генерируется аминоксидазой и глюкозооксидазой. Кроме того, постоянно образуют пероксид водорода макрофаги, клетки эндотелия. Перекисное окисление липидов сопровождается образованием органических пероксидов. Следует отметить, что оксоферрильные формы гемопротейнов могут образовываться не только в реакциях с пероксидами, но и при взаимодействии с пероксинитритом [4, 5].

Стационарная концентрация пероксида водорода в крови при нормальных условиях, вследствие разрушения каталазой и глутатионпероксидазой, не превышает 0,2 нМ [3]. Однако даже под действием этой низкой концентрации пероксида водорода миоглобин постоянно окисляется с образованием феррильной формы миоглобина с радикалом, локализованным на белковой глобуле [6].

Концентрация пероксида водорода в крови и тканях сильно возрастает при патологических состояниях, например, при ишемии-реперфузии, и может достигать 10 мкМ и выше в сердечной мышце при ишемии [7]. При гипоксических и воспалительных состояниях увеличивается уровень нитрита в тканях параллельно с возрастанием образования монооксида азота. Как известно, оксид азота обладает защитным действием на ткани, подвергнутые повреждению высоким уровнем пероксидов водорода. Нитрит, напротив, вызывает сильнейшее повреждающее действие на ткани в присутствии пероксидов и гемопротейнов. Высокая токсичность нитрита вызвана образованием диоксида азота в присутствии пероксида водорода и гемопротейнов [8]. Диоксид азота нитрует тирозинильные остатки белков и ферментов и вызывает их инактивацию и нарушение нативной структуры.

В данной работе мы показали, что при взаимодействии пероксида водорода с ферри-формами миоглобина лошади формируются высокорекреационные оксоферрильные формы гемопротейнов, которые окисляют тиамин и его фосфорные эфиры до тиохрома, тиаминдисульфида и их фосфатов, соответственно. Нитрит и фенольные соединения на 1-2 порядка увеличивают выход продуктов окисления тиамин и его фосфорных эфиров

под действием оксоферрильных форм миоглобина. В присутствии нитрита тиамин претерпевает более глубокие превращения, нежели в присутствии фенольных соединений.

Полученные результаты позволяют предположить, что гидрофобный метаболит тиамин – тиохром, который легко проникает в клеточные мембраны, может явиться эффективным антиоксидантом, инактивирующим диоксид азота.

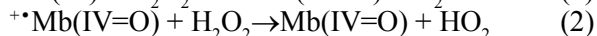
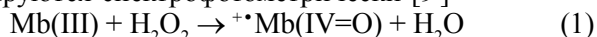
Материалы и методы

В работе использовали тиамин, тиаминмонофосфат (ТМФ), тиаминдифосфат (ТДФ), тиохром, аминокислоты: L- и D-тирозин, D,L-аргинин, D,L-гистидин, D,L-валин, D,L-фенилаланин, L-серин, миоглобин из сердца лошади фирмы Сигма (США).

Концентрацию тиохрома и оксодигидротиохрома в смеси определяли флуоресцентным методом. Для этого спектр флуоресценции смеси разлагали на индивидуальные спектры тиохрома и оксодигидротиохрома на основе метода наименьших квадратов. В качестве стандартов использовали коммерческий препарат тиохрома (Сигма) [2]. Для измерения концентрации оксодигидротиохрома в реакционную смесь, содержащую метмиоглобин и пероксид водорода, добавляли бутанол. Концентрацию оксодигидротиохрома определяли по его флуоресценции в спиртовой фракции.

Результаты

После смешивания метмиоглобина с пероксидом водорода наблюдали образование оксоферрильных форм миоглобина, которые легко регистрируются спектрофотометрически [9]



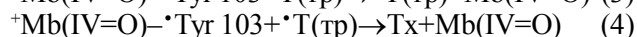
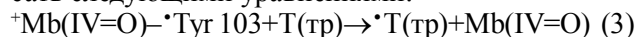
Ранее методом ЭПР было показано, что в растворе существуют две оксоферрильные формы миоглобина: ${}^+\text{Mb(IV=O)}$ оксоферрильная форма с радикалом, локализованным на порфирине или белковой глобуле (соединение I), а также оксоферрильный катион миоглобина Mb(IV=O) (или соединение II). Оксоферрильная форма ${}^+\text{Mb(IV=O)}$ с радикалом, локализованным на остатке порфирина может захватывать электрон от остатка тирозина 103 [10]. В результате внутримолекулярного переноса электрона порфириновый радикал восстанавливается тирозином 103 и наблюдается формирование долгоживущего тирозин-феноксильного радикала, локализованного на остатке тирозина-103 (${}^+\text{Mb(IV=O)}\text{-}\cdot\text{Tyr}(103)$) [11].

Мы показали, что в присутствии тиамин скорость образования метмиоглобина возрастала. Процесс разрушения оксоферрильной формы миоглобина сопровождался окислением тиамин с образованием тиохрома и тиаминдисульфида. Тиохром и тиаминдисульфид были идентифицированы методом восходящей хроматографии на бумаге. Тиохром обладает интенсивной флуоресценцией, поэтому образование тиохрома легко можно контролировать флуоресцентным методом.

Предварительная инкубация метмиоглобина с пероксидом водорода до добавления тиамин в течение различных промежутков времени не сказывалась существенно на выходе тиохрома. Образование тиохрома практически не отличалось от выхода тиохрома, когда все компоненты смеси Mb(III) + T + H₂O₂ были добавлены в раствор одновременно. Поэтому можно предположить, что тиамин не способен входить в гемовый карман и не взаимодействует с короткоживущей оксоферрильной формой миоглобина, содержащей радикал, локализованный на порфирине (${}^+\text{Mb(IV=O)}$). Вероятно, тиамин окисляется до тиохрома и тиаминдисульфида при взаимодействии с тирозин-феноксильными радикалами, образовавшимися вследствие восстановления порфириновых радикалов остатками тирозина 103 белковых макромолекул.

В нейтральной среде тиамин присутствует в форме с закрытым тиазоловым кольцом, а содержание его минорных форм – трициклической и тиольной форм – не превышает 1-2% от общей концентрации тиамин в растворе.

Окисление трициклической формы тиамин T(tr) в тиохром, которое протекает вследствие ее взаимодействия с тирозильными радикалами, локализованными на белковой глобуле, можно описать следующими уравнениями:



Тиохром образуется также при протекании реакции диспропорционирования, вследствие взаимодействия свободно-радикальных форм тиамин.



В присутствии метмиоглобина из сердца лошади и пероксида водорода тиольная форма тиамин окисляется в тиаминдисульфид вследствие взаимодействия с тирозильными радикалами гемопротейна.



Под действием высоких концентраций тирозина или тирамина (1 мМ и выше) выход тиохрома, вследствие окисления тиамин оксоферрильными формами миоглобина и гемоглобина, возрастает на порядок и более, по сравнению с раствором, не содержащим фенольных соединений (табл. 1).

Таблица 1 – Изменение интенсивности флуоресценции тиохрома при инкубации тиамин с миоглобином и пероксидом водорода в присутствии фенольных соединений и аминокислот $\lambda_{\text{возб.}}=370$ нм, $\lambda_{\text{фл.}}=450$ нм

№ п/п	Состав инкубационной смеси	pH	I _{фл.} в момент времени после смешивания, отн. ед.		
			0 мин	20 мин	40 мин
1	ТМП ^a	7,2	44	55	75
2	ТМП ^a + 2 мМ Фенола	7,25	132	8500	12600
3	ТМП ^a + 2 мМ L-триптофана	7,0	48	135	276
4	ТМП ^a + 2 мМ Тирамина	7,0	76	2250	3800
5	ТМП ^a + 2 мМ L-тирозина	7,0	50	2000	3600

^aТМП – смесь 1 мкМ метМв, 1 мМ тиамин и 2 мМ H₂O₂.

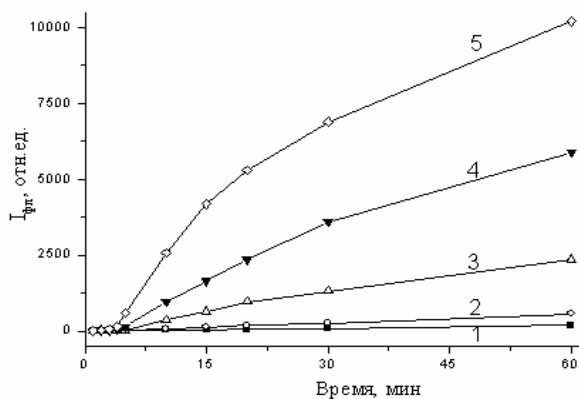


Рисунок 1 – Зависимость выхода тиохрома от концентрации D-тирозина в инкубационной смеси, содержащей 5 мМ H_2O_2 , 1 мМ тиамин, 1 мкМ метмиоглобина. Концентрация D-тирозина в пробах: (1) – 0 мМ, (2) – 0,1 мМ, (3) – 0,5 мМ, (4) – 1 мМ, (5) – 2 мМ. $\lambda_{возб.} = 370$ нм, $\lambda_{фл.} = 450$ нм

Другие аминокислоты, D,L-аргинин, D,L-гистидин, D,L-валин, D,L-фенилаланин, L-серин не оказывали влияния на выход тиохрома.

Мы показали, что фенольные соединения на 1-2 порядка увеличивают выход продуктов окисления тиамин и его фосфорных эфиров под действием оксоферрильных форм миоглобина или оксоферрильных форм гемоглобина.

Мы предполагаем, что молекулы тирозина и молекулы других фенольных соединений восстанавливают радикал порфирина оксоферрильной формы миоглобина до нейтральной молекулы, вследствие межмолекулярного переноса электрона, а сами окисляются с образованием тирозинильных радикалов или феноксильных радикалов фенольных соединений, соответственно. Образовавшиеся тирозинильные радикалы и радикалы фенольных соединений окисляют тиамин до тиохрома и тиаминдисульфида. Возрастание выхода флуоресцирующих продуктов окисления тиамин в присутствии тирозина (рис.1) свидетельствует о более высокой константе скорости взаимодействия свободного радикала порфирина с L-тирозином, нежели свободного радикала порфирина с тиамином. L-тирозин в этом случае выступает в роли межмолекулярного «челнока», обеспечивая перенос электрона, инактивируя свободный радикал порфирина и вызывая окисление тиамин.

После добавления нитрита к водному раствору, содержащему метмиоглобин, тиамин и пероксид водорода, наблюдали возрастание выхода продуктов окисления тиамин, по сравнению с растворами, не содержащими нитрита. Флуоресцирующие продукты окисления тиамин были идентифицированы как тиохром и оксидигидроксиохром методом восходящей бумажной хроматографии.

Известно, что нитрит взаимодействует с оксоферрильными формами гемоглобина с образованием диоксида азота [9]. Мы показали, что тиохром, образующийся под действием оксоферрильных

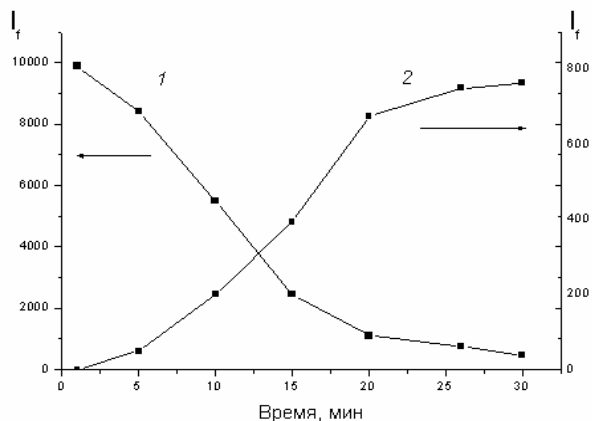


Рисунок 2 – Уменьшение флуоресценции тиохрома (1) и рост флуоресценции оксидигидроксиохрома (2) после инкубации тиохрома в растворе, содержащем метмиоглобин, пероксид водорода, нитрит. Начальная концентрация тиохрома 10 мкМ, метМб – 5 мкМ, концентрация H_2O_2 и нитрита – 1 мМ

форм миоглобина на тиамин, эффективно окисляется диоксидом азота до оксидигидроксиохрома (рис. 2).

Были изучены спектрально-флуоресцентные свойства оксидигидроксиохрома и обнаружено, что квантовый выход его флуоресценции в водном растворе низок (~3 %), но сильно увеличивается в спиртах (26% в бутаноле). Поэтому концентрацию образовавшегося оксидигидроксиохрома определяли после его экстракции бутанолом из водных растворов флуоресцентным методом.

Обсуждение

Тиаминдифосфат (ТДФ) является кофактором таких важнейших ферментов энергетического метаболизма как пируватдегидрогеназа и α -кетоглутаратдегидрогеназа. Под действием пируватдегидрогеназы происходит окислительное декарбоксилирование пирувата, который образуется из глюкозы в цикле Эмбдена-Меерхофа. ТДФ также является кофактором транскетолазы, ключевого фермента пентозофосфатного цикла [12]. Кроме ТДФ в тканях организма всегда присутствуют некоферментные производные тиамин. Соотношение тиамин и его фосфорных эфиров составляет обычно следующие величины: тиамин 10-12%, ТМФ 10-15%, ТДФ 70-75%, ТТФ 2-3% [13]. В тканях животных и человека, кроме фосфатов тиамин, постоянно присутствуют тиаминдисульфид и тиохром.

В последнее время, наряду с выяснением механизмов основных реакций, в которых каталитическую роль играет ТДФ, стали накапливаться данные о высокой биологической активности некоферментных метаболитов тиамин. Недавно показано, что тиольная форма тиамин высвобождает из состава S-нитрозоглутатиона оксид азота, который вызывает релаксацию сосудов [14].

Тиамин уменьшает повреждение нейронов при окислительном стрессе [15]. Кроме того, тиамин (особенно бенфотиамин) предотвращает повреж-

дение сосудов при сахарном диабете, предупреждает развитие нефропатий, снижает уровень токсических продуктов неэнзиматического гликозилирования белков [16, 17]. Тиамин обладает некоферментным действием и вызывает нейро- и кардиопротекторный эффект, инактивируя диоксид азота и другие активные формы азота.

Защитное действие тиамин реализуются, вероятно, через образование гидрофобных метаболитов тиамин – тиохрома и оксодигидротиохрома. Нервная и сердечная ткань содержит наиболее высокие концентрации депонированного тиамин.

В данной работе мы показали, что оксоферрильные формы миоглобина и тирозинильные радикалы окисляют тиамин, а также его фосфорные эфиры с образованием тиохрома, оксодигидротиохрома и тиаминдисульфида и их фосфорных эфиров, соответственно. Следовательно, при окислительном стрессе уменьшается содержание тиамин вследствие трансформации в неактивные соединения. Тиамин ингибирует образование дитиозина и межбелковых сшивок в кардиомиоцитах при окислительном стрессе в реакциях, катализируемых оксоферрильными формами гемоглобина. Мы предполагаем, что тиамин обладает некоферментным действием и вызывает нейро- и кардиопротекторный эффект, инактивируя диоксид азота и другие активные формы азота.

Диоксид азота эффективно нитрует остатки тирозина в различных ферментах и таким образом инактивирует их. Тиамин взаимодействует с диоксидом азота и разрушает его, что приводит к ингибированию реакции нитрования тирозинильных остатков белков.

Структурные особенности молекулы тиамин обеспечивают существование в нейтральной среде нескольких его минорных форм, находящихся между собой в равновесии. Минорная трициклическая форма тиамин легко окисляется в тиохром, растворимость которого в гидрофобной среде примерно в 100 раз выше, нежели растворимость тиамин. Диоксид азота легко растворяется в гидрофобных компонентах клеточных мембран, проникает в гидрофобные области белков. Поэтому весьма важно для нормального функционирования клеток наличие в достаточном количестве в клеточных мембранах эффективных гидрофобных антиоксидантов, способных инактивировать активные формы азота. Широко применяемые в настоящее время соединения – антиоксиданты – не обеспечивают эффективную защиту сердечно-сосудистой системы от повреждения при окислительном и нитрозильном стрессе.

Полученные результаты позволяют заключить, что при совместном воздействии тиамин и его гидрофобные метаболиты ингибируют реакции нитрования белков и ферментов, как в водных, так и в

гидрофобных средах, и, следовательно, защищают биологические системы от повреждения диоксидом азота.

Литература

- 1 Шумаев К.Б., Петрова Н.Э., Заббарова И.В., Ванин А.Ф., Топунов А.Ф., Ланкин В.З., Рууге Э.К. Взаимодействие оксоферрилмиоглобина и динитрозильных комплексов железа // Биохимия. - 2004. - Т.69, № 5. - С.699-705.
- 2 Степура А.И., Адамчук Р.И., Опарин А.Ю., Степура И.И. Тиамин ингибирует образование дитиозина, специфического маркера окислительного стресса, в реакциях, катализируемых оксоферрильными формами гемоглобина // Биохимия. - 2008. - Т. 73, №9. - С. 1281-1293.
- 3 Giulivi C., Davies J.A. Hydrogen peroxide –mediated ferrilhemoglobin generation in vitro and in red blood cells // Methods Enzymol. - 1994. - V. 231. - P. 490-496.
- 4 Cooper C.E. Nitric oxide and iron proteins // Biochim. Biophys. Acta. - 1999. - V. 1411. - P. 290-309.
- 5 R. Floris, S.R. Piersma, G. Yang, P. Jones, R. Wever, Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase // Eur. J. Biochem. - 1993. - V. 215. - P. 767-775.
- 6 Witting P.K., Liao W.-Q., Harris M.J., Neuzil J. Expression of human myoglobin in H9c2 cells enhances toxicity to added hydrogen peroxide // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2006. - V. 348. - P. 485-493.
- 7 Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs // Physiol. Rev. - 1979. - V. 59. - P. 527-605.
- 8 van der Vliet A., Eiserich J.P., Halliwell B., Cross C.E. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity // J. Biol. Chem. - 1997. - V. 272. - P. 7617-7625.
- 9 Herold S., Rehman F.J.K. Kinetic and mechanistic studies of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl myoglobin // J.Biol.Inorg.Chem. - 2001. - V. 6. - P. 543-555.
- 10 Witting P.K., Mauk A.G. Reaction of human myoglobin and H₂O₂. Electron transfer between tyrosine 103 phenoxyl radical and cysteine 110 yields a protein-thiyl radical // J. Biol. Chem. - 2001. - V. 276. - P. 1654-1657.
- 11 Witting P.K., Mauk A.G., Lay P.A. Role of tyrosine-103 in myoglobin peroxidase activity: kinetic and steady-state on the reaction of wild-type and variant recombinant human myoglobins with H₂O₂ // Biochemistry. - 2004. - V. 41. - P. 11495-11503.
- 12 Tanphaichitr V. in Handbook of vitamins (Rucker, R., Suttie, J. ed.), Marcell Dekker, N.Y., 2001, pp. 275-316.
- 13 Lonsdale D. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives. // Evid. Based Complement. Alternat. Med. - 2006. - V. 3(1). - P. 49-59.
- 14 Степура, А.И., Пилецкая, Т.П., Степура, И.И. Роль тиольной формы тиамин в обмене оксида азота // Биохимия. - 2005. - Т. 70. - С. 416-429.
- 15 Kruse M., Navarro D., Desjardins P., Butterworth R.F. Increased brain endothelial nitric oxide synthase expression in thiamine deficiency: relationship to selective vulnerability // Neurochem. Int. - 2004. - V. 45(1). - P. 49-56.
- 16 Booth A.A., Khalifah R.G., Hudson B.G. Thiamine pyrophosphate and pyridoxamine inhibit the formation of antigenic advanced glycation end-products: comparison with aminoguanidine // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1996. - V.220. - P. 113-119.
- 17 Hammes H.P., et.al. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy // Nat. Med. - 2003. - V. 9(3). - P. 294-299.

Поступила 08.04.09

Работа выполнена при поддержке грантов Министерства образования РБ и БРФФИ №Б08Р-216.