

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ

На правах рукопису

**ВОВК Андрій Іванович**

**ХІМІЧНІ МОДЕЛІ ТА МЕХАНІЗМИ ТІАМІНДИФОСФАТ-  
ЗАЛЕЖНИХ ОКИСНО-ВІДНОВНИХ ПЕРЕТВОРЕНЬ**

02.00.10 - біоорганічна хімія,  
хімія природних та фізіологічно активних речовин

**А в т о р е ф е р а т**  
**дисертації на здобуття наукового ступеня**  
**доктора хімічних наук**

**Київ - 1996**

НБ. 35 812

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі хімії фотосинтезу

Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України

Офіційні опоненти: член-кор. НАН України,  
доктор хімічних наук, професор  
Г.О.Ковтун

доктор хімічних наук, професор  
С.Д.Ісаєв

доктор біологічних наук, професор  
С.О.Костерін

Провідна організація: Інститут органічної хімії НАН України,  
м. Київ

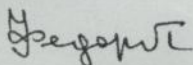
Захист відбудеться 15 листопада 1996 р. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.01.80.01 в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України (253660, Київ-94, вул. Мурманська, 1).

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України (253660, Київ-94, вул. Мурманська, 1)

Автореферат розісланий 14 жовтня 1996 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради



Д.М.Федоряк

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00759986 (1)

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Механізми коферментної дії тіамінди-фосфату (ТДФ) значною мірою ґрунтуються на закономірностях перебігу модельних реакцій карбонільних сполук, що їх каталізують тіамін (вітамін В<sub>1</sub>) та інші солі тіазолію. Це стосується, зокрема, утворення проміжних тіазолієвого ілідю та С(α)-енаміну ("активного альдегіду") (Breslow, 1958; Krampitz, 1967; Jordan, 1992), стадій декарбоксилування (Lienhard, 1978; Kluger, 1987) та переходу протону (Washabaugh & Jencks, 1988; Schellenberger, 1990). Однак механізми ТДФ-залежних окисно-відновних стадій досі мало з'ясовано. Як початковий можна класифікувати і стан досліджень модельних ТДФ-залежних систем, що на окремих стадіях каталізу піддаються впливові екзогенного нефізіологічного окисника. Щоб відтінити характер впливу екзогенної сполуки, якщо вона спричиняє перетворення інтермедіату ферментативної реакції, вживається термін "паракаталітична взаємодія" (Sümeđi & Alkonyi, 1983). Механістичні аспекти паракаталітичних окисно-відновних взаємодій, з огляду на функціонування ТДФ-залежних ферментів, і визначали спрямування наших досліджень.

В цій роботі основну увагу зосереджено на дослідженні нових модельних перетворень тіазолієвого іону в реакціях окиснення або окиснювального розкладу карбонільних сполук при взаємодії з хінонами або молекулярним киснем. Поряд з цим вивчалися відповідні окисно-відновні системи дріжджової піруватдекарбоксилази (К.Ф. 4.1.1.1), до складу яких входили субстрат і екзогенний окисник. Актуальність дослідження тіазолієвого каталізу, як в хімічних, так і в біохімічних реакціях, обумовлюється, передусім, необхідністю становлення фундаментальних уявлень про механізми ТДФ-залежного окиснення, що є природною функцією ферменту або має певну подіб-

ДНБ ім. В. Стефаніка  
А. П. Кравець

ність до перетворень при порушенні його функціонування. Прояснення закономірностей таких взаємодій сприяє розумінню механізмів токсичності хінонових та інших здатних до відновлення ксенобіотиків, що попадають в організм через лікарські засоби чи внаслідок забруднення довкілля. Результати таких досліджень є важливими для з'ясування можливих причин виникнення та розвитку патологій, що супроводжуються зниженням активності ТДФ-залежних ферментів та зміною тіамінового статусу організму. Залишається актуальним, зважаючи на широкий спектр біологічних функцій вітаміну  $B_1$  та тіамінфосфатів, цілеспрямований пошук нових лікарських речовин.

Мета роботи – з'ясування механізмів окисно-відновних перетворень, що відбуваються за участю іону тiazолію в модельних хімічних та ферментативних ТДФ-залежних системах. Ця мета включала комплексне дослідження неферментативного каталізу солями тiazолію за наявності окисників, в тому числі хінонів або молекулярного кисню, і відповідних паракаталітичних перетворень дріжджової піруватдекарбоксілази.

#### Завдання дослідження.

1. Встановлення кінетичних закономірностей та механізмів каталітичної дії солей тiazолію в реакціях окиснення альдегідів, розкладу 1,2-дикетонів та окиснювального розкладу піровиноградної кислоти при взаємодії з хінонами.

2. Вивчення механізмів окиснювального розкладу 2-(1-гідроксибензил)тіаміну та його тiazолієвих аналогів при взаємодії з основою та заміщеними хінонами, молекулярним киснем або фериціанідом.

3. Експериментальне обґрунтування радикальних стадій тiazолієвого каталізу. З'ясування механізмів інгібуючої дії молекулярного кисню в реакціях, що їх каталізують тіамін або інші солі тiazолію.

Дослідження механізмів сольватації іону тiazолію метанолом.

4. Дослідження закономірностей функціонування дріжджової піруватдекарбоксилази за наявності субстрату та екзогенного окисника - хінону або молекулярного кисню. З'ясування механізмів паракаталітичних перетворень піруватдекарбоксилази за наявності хінонових акцепторів електронів. Встановлення кореляцій між структурою окисника і його впливом на фермент.

5. Дослідження активного центру дріжджової піруватдекарбоксилази та аналіз відповідності механізмів модельних хімічних реакцій за участю тiazолієвого іону механістичному перебігові ферментативних паракаталітичних перетворень.

6. Обґрунтування напрямів пошуку та синтез нових біологічно активних сполук - структурних аналогів вітаміну  $B_1$ .

Теоретична і практична цінність. Отримані результати збагачують уявлення про модельний тiazолієвий каталіз та каталіз дріжджовою піруватдекарбоксилазою за наявності екзогенних окисників. Механістичні закономірності модельного впливу штучних нефізіологічних акцепторів електронів можуть стати основою подальших досліджень функціонування ТДФ-залежних ферментів. Закономірності хімічних окисно-відновних перетворень, а також вплив молекулярного кисню мають загальний характер і є важливими при розробці біомімітичних методів синтезу органічних сполук у реакціях, що їх каталізують солі тiazолію. Уявлення про механізми гідрофобних взаємодій вітаміну  $B_1$  та тіамінфосфатів з білками можуть сприяти цілеспрямованому пошуку біологічно активних похідних тiazолію.

Наукова новизна. Вперше проведено систематичне дослідження механізмів окисно-відновних реакцій, що їх каталізують солі тiazолію, та стадій, що спричиняють інгібування тiazолієвого каталізу.

Виходячи з закономірностей модельного впливу окисників, обґрунтовано механізми перебігу паракаталітичних ТДФ-залежних перетворень.

Зокрема:

- встановлено загальні та кінетичні закономірності каталітичної дії солей тіазолію в окисно-відновних реакціях альдегідів, 1,2-дикетонів та пірвіноградної кислоти; з'ясовано закономірності впливу структури 2-(1-гідроксибензил)- та 2-(1-гідроксиетил)тіазолієвих іонів на їх реакційну здатність при взаємодії з основою та хіноном, молекулярним киснем або фериціанідом;

- знайдено, що каталіз тіаміном або розклад 2-(1-гідроксибензил)тіазолієвих солей за аеробних умов супроводжується утворенням тіазолієвих катіон-радикалів з неспареним електроном в тіазолієвому циклі та з'ясовано їх структуру;

- на основі кінетичних та спектральних даних сформульовано принципово новий механізм інгібування тіазолієвого каталізу молекулярним киснем, що включає на перших стадіях радикальне окиснення проміжного іонізованого C(α)-енаміну;

- встановлено, що за наявності субстрату та екзогенних хінону чи молекулярного кисню відбувається незворотна інактивація дріжджової піруватдекарбоксилази; з'ясовано кінетичні закономірності паракаталітичної інактивації піруватдекарбоксилази за наявності хінонів, окиснювальної системи заміщений хінон - фериціанід; знайдено, що факторами, які визначають паракаталітичну трансформацію "активного ацетальдегіду" в активному центрі ферменту, є редокс потенціал окисника та природа оточення;

- знайдено, що алкілфосфати є конкурентними стосовно субстрату інгібіторами дріжджової піруватдекарбоксилази; встановлено залежність інгібування від структури інгібітора; з'ясовано, що гід-

рофобне оточення може утруднювати транспорт протону в процесі паракаталітичних перетворень ферменту;

- досліджено системи, що моделюють сольватацію іону тiazолію; з'ясовано закономірності інактивації дріжджової апопіруватдекарбоксилази N-алкільними та N-алкілоксикарбонілметильними аналогами вітаміну B<sub>1</sub>;

- на основі експериментальних досліджень модельного хімічного та ферментативного каталізу сформульовано механізми паракаталітичних окисно-відновних перетворень дріжджової піруватдекарбоксилази та гіпотезу про вплив молекулярного кисню і хінонових ксенобіотиків на функціонування піруватдегідрогеназного комплексу.

Рівень реалізації, впровадження. Синтезовані нами N-алкілоксикарбонілметилтіазолієві аналоги вітаміну B<sub>1</sub> знаходять застосування як модельні сполуки при біологічних дослідженнях нейротропності тіаміну. Деякі з синтезованих речовин, серед них 3-децоксикарбонілметил-4-метил-5-β-гідроксиетилтіазолій хлорид та 3-децоксикарбонілметил-4-метилтіазолій хлорид, ефективно пригнічують нервово-мускульну передачу та проявляють транквілізуючу дію. Ці дослідження можуть скласти підґрунтя створенню нових лікарських засобів.

Апробація. Результати досліджень доповідалися або подавалися на IV Міжнародному симпозиумі з гомогенного каталізу (Ленінград, 1984), Всесоюзній конференції "Кинетика и механизм электронного переноса в белковых системах и их моделях" (Вільнюс, 1985), Всесоюзному симпозиумі "Химическая физика и ферментативный катализ" (Таллінн, 1987), XIV Менделєєвському з'їзді з загальної та прикладної хімії (Ташкент, 1989), I Національному з'їзді фармакологів України (Полтава, 1995), XVI (Тернопіль, 1992) і XVII (Харків,

1995) Українських конференціях з органічної хімії, Міжнародному симпозіумі "Вітаміни и здоровье населения Беларуси и смежных регионов" (Гродно, 1995), наукових конференціях Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України (1989, 1995).

Публікації. Результати роботи викладено в 43 наукових публікаціях. Серед них 31 стаття, монографія (у співавторстві), оглядова стаття, авторське свідоцтво СССР та 9 тез доповідей.

Структура та обсяг роботи. Літературний розділ роботи вміщує детальний аналіз даних, що стосуються механізмів модельного хімічного каталізу солями тіазолію і тіаміном та ферментативного ТДФ-залежного каталізу. В трьох розділах подано результати експериментальних робіт та їх обговорення. В додатку містяться дані дослідження біологічної активності структурних тіазолієвих аналогів вітаміну В<sub>1</sub>. Обсяг роботи складає 307 стор., 16 таблиць, 67 малюнків. Список літератури налічує 352 назви.

Конкретний внесок дисертанта. Автор поставив мету і окреслив завдання дослідження, інтерпретував та узагальнив отримані результати, сформулював наукові висновки. Експериментальну частину роботи виконано за його безпосередньою участю. Автор вдячний чл.-кор. НАН України, професору О.О.Ясникову, який започаткував дослідження тіаміну в інституті та всіляко сприяв їх розвитку, а також докт. біол. наук Ю.М.Пархоменко, докт. біол. наук О.В.Романенку, докт. мед. наук Л.М.Зайцеву, докт. хім. наук Й.М.Сосонкіну, канд. хім. наук І.В.Муравйовій за співпрацю на різних етапах роботи.

Методологія, методи дослідження.

Використовували дріжджову піруватдекарбоксілазу (Sigma) та препарати піруватдекарбоксілази, що виділялися з пивних дріжджів (Черникевич и др., 1991). Останні очищали методом афінної хромато-

графії на тіамін-N-4-азобензоїл-ε-амінокапроїлгідрозидоцефалозі 4E (Кляшицкий и др., 1980), або за допомогою іонообмінної хроматографії на DEAE-Toyopearl 650. Апопіруватдекарбоксілазу відділяли хроматографією на сефадексі G-25 (Ullrich, 1970). Активність піруватдекарбоксілази визначали за витрачанням NADH в супряженій алкогільдегідрогеназній реакції.

Анаеробні умови при дослідженні хімічних перетворень досягалися почерговим відкачуванням та переморожуванням розчинів реагуючих речовин, що знаходились в спеціальних скляних приладах з розгалуженнями. Техніка високого вакууму забезпечувала залишковий тиск  $1 \cdot 10^{-2}$  Па. Для спектральних вимірювань прилад мав декілька ампул, що перепаявалися після вакуумування. Для кінетичних досліджень в анаеробних умовах прилад був з'єднаний з кварцевою кюветою і розміщувався в кюветоприймачі спектрофотометра.

Для визначення хінонів, 2-α-гідроксибензильних і 2-α-гідроксиетильних похідних тiazолію, тіохрому використовували спектрофотометричний аналіз. Ацилоїни і піровиноградну кислоту визначали колориметрично (Ясников и др., 1975; Berntsson, 1955). Ацетилбензоїл, метилбензоат, метилацетат визначали методом ГРХ. Кисень визначали хроматографічно або манометрично. Тіазолієві солі визначали полярографічно на каломельному (Бабичева, 1971) або дисковому золотому амальгамованому електродах (Сосонкин и др., 1975).

Тіазоли, солі тiazолію та їх 2-α-гідроксиетильні і 2-α-гідроксибензильні похідні синтезовано відомими методами.

Спектри ПМР зареєстровано на спектрометрах Bruker WP-200 і Varian Gemini-200, спектри ЕПР - на приладі Varian E-9, електронні спектри - на спектрофотометрах Specord UV-VIS і Specord M-40. Для хроматографічного аналізу використовували прилади ЛХМ-80, Хром-5.

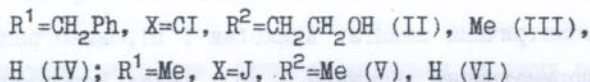
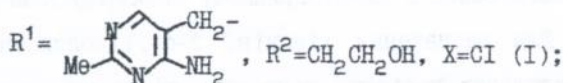
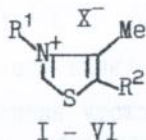
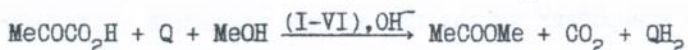
## ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ

## 1. МОДЕЛЮВАННЯ ТДФ-ЗАЛЕЖНИХ ПЕРЕТВОРЕНЬ:

ОКИСНО-ВІДНОВНІ РЕАКЦІЇ, ЩО ЇХ КАТАЛІЗУЮТЬ СОЛІ ТІАЗОЛІЮ

1.1. Механізми каталітичної дії солей тіазолію в реакціях окиснення альдегідів хінонами та окиснювального розкладу піровиноградної кислоти

Тіамін (вітамін В<sub>1</sub>) (I) та солі тіазолію, що не заміщені в положенні 2 (II-VI), за наявності основи каталізують реакції окиснення альдегідів та окиснювального декарбоксілювання піровиноградної кислоти алкілзаміщеними хінонами (Q). При цьому в метанолі утворюються метилові естери карбонових кислот та гідрохінони.



В певному інтервалі концентрацій субстрату реакції окиснення бензальдегіду та окиснювального розкладу піровиноградної кислоти при взаємодії з триметил-1,4-бензохіноном підкоряються закономірностям псевдопершого порядку згідно рівняння:

$$v = k_1^{obs} [S]^1 [Q]^0,$$

де S - бензальдегід чи піровиноградна кислота. Величини констант швидкості псевдопершого порядку, що спостерігаються, пропорційні концентрації каталізатора, тобто  $k_1^{obs} = k_2^{obs} [C]$ , де C - сіль тіазолію. Константи швидкості другого порядку  $k_2^{obs}$  зменшуються внаслідок заміни бензильного замісника в положенні 3 тіазолію на ме-

тильну групу, а в реакції окиснення бензальдегіду - також за наявності β-гідроксиетильного залишку в положенні 5 (табл. 1).

Сіль тіазолію	$k_2^{obs} \cdot 10^2, M^{-1}c^{-1}$	
	а	б
II	1,49±0,13	8,7±1,3
III	1,47±0,19	21,0±1,7
IV	1,46±0,23	20,7±2,4
V	0,95±0,10	10,0±1,2
VI	0,91±0,12	7,3±1,4

Таблиця 1

Константи швидкості реакції окиснювального розкладу пірвіноградної кислоти (а) та окиснення бензальдегіду (б) триметил-1,4-бензохіноном. Метилловий спирт, 35°C; [KOH] 0,025 M (а), 0,006 M (б); досліди без кисні повітря.

Окисно-відновною стадією, що не лімітує загальну швидкість перетворення бензальдегіду чи пірвіноградної кислоти, є взаємодія окисника з проміжним C(α)-енаміном. Останній утворюється внаслідок переходу протону від 2-(1-гідроксибензил)тіазолієвого іону на основу або декарбоксилювання 2-(2-лактил)тіазолію. Ці стадії залежать від індуктивного впливу замісника в положенні 3. 2-Бензоїльне чи 2-ацетильне похідне тіазолію після швидкого метанолізу забезпечує регенерацію каталізатора і утворення естеру (схема 1).

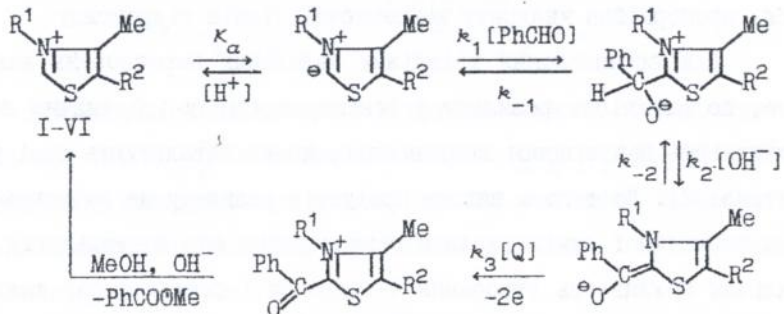


Схема 1

Враховуючи матеріальний баланс вільного іону тіазолію, що знаходиться в рівновазі з тіазолієвим ілідом, та його адукту з бензальдегідом, а також за умови, що  $k_3[Q] \gg k_{-2}$ , швидкість реакції можна описати рівнянням:

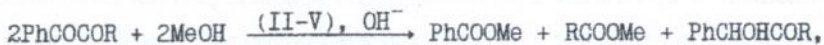
$$v = \frac{k_1 k_2 K_\alpha [S] [C] [OH^-]}{k_{-1} [H^+] + k_1 K_\alpha [S]}$$

Перший порядок за бензальдегідом відповідає співвідношенню  $k_{-1}[H^+] \gg k_1 K_\alpha [S]$ . При цьому  $k_2^{obs} = K_1 K_\alpha k_2 [OH^-]/[H^+]$ , де  $K_1 = k_1/k_{-1}$ .

## 1.2. Механізми каталітичної дії солей тіазолію

### в реакціях розкладу 1,2-дикетонів

1,2-Дикетони в метиловому спирті за наявності солей тіазолію, що не заміщені в положенні 2, та основи розкладаються з утворенням метилових естерів карбонових кислот і ацилоїнів:



де R=Ph, Me. При незмінній концентрації каталізатора швидкість розкладу 1-фенілпропандіону-1,2 (S) описується рівнянням:

$$v = k_2^{obs} [S]^2,$$

а величина константи швидкості другого порядку, що спостерігається, пропорційна квадрату концентрації іонів гідроксиду.

Для встановлення механізму модельних перетворень важливим є те, що швидкість розкладу 1-фенілпропандіону-1,2 значно перевищує швидкість бензоїнової конденсації, що її каталізують солі тіазолію (табл. 2). До того ж виходи продуктів розкладу не змінюються, якщо до реакційної суміші додати бензальдегід або ацетальдегід. Це виключає можливість утворення 1-гідрокси-1-фенілацетону шляхом розщеплення 1,2-дикетону до естеру та альдегіду з наступним перебігом ацилоїнової конденсації. Очевидно, адукт тіазолієвої солі з

1,2-дикетоном продукує С(α)-енамін, який в наступних стадіях відновлює субстрат до ацилоїну (схема 2).

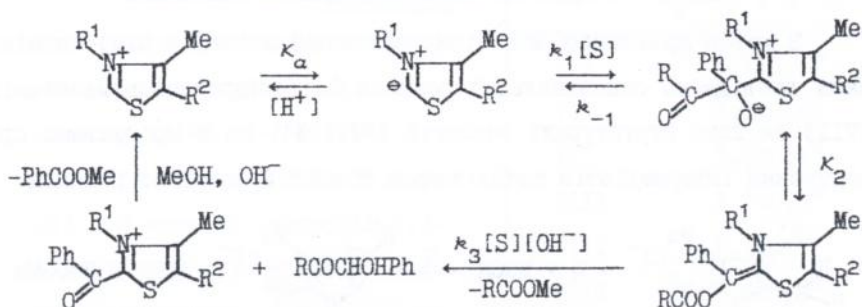


Схема 2

Таблиця 2

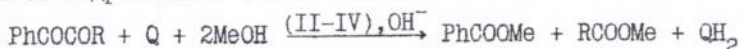
Сіль тіа- золію	$k_2^{obs}, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	
	а	б
II	$1,5 \cdot 10^{-2}$	$2,8 \cdot 10^{-4}$
III	$2,3 \cdot 10^{-2}$	$7,3 \cdot 10^{-4}$
V	$7,0 \cdot 10^{-2}$	$9,8 \cdot 10^{-4}$

Константи швидкості реакцій розкладу ацетилбензоїлу (а) та бензоїнової конденсації (б). Каталізатор 0,005 М (а), 0,06 М (б); КОН 0,006 М (а), 0,06 М (б); 36°C; без кисню повітря.

Виходячи з матеріального балансу вільного тіазолієвого іону та його адуктів з 1,2-дикетоном, швидкість реакції описується рівнянням:

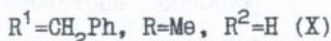
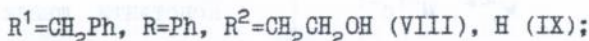
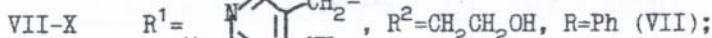
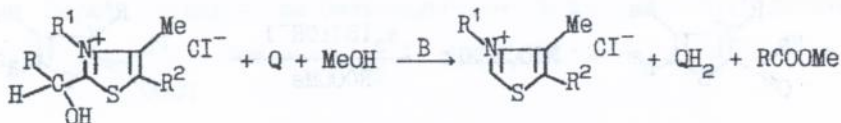
$$v = \frac{k_1 k_3 K_a K_2 [S]^2 [C][\text{OH}^-]}{k_{-1} [\text{H}^+] + k_1 K_a [S](1 + K_2)}$$

де С - концентрація каталізатора. Другий порядок за субстратом свідчить про те, що  $k_2^{obs}$  може визначитися як  $k_3 K_a K_1 K_2 [C][\text{OH}^-]/[\text{H}^+]$ . Цей механізм підтверджується тим, що при дії замішених хінонів, що швидко окиснюють С(α)-енамін, продуктами розкладу 1,2-дикетону є естери та гідрохінон:



### 1.3. Механізми окиснювального розкладу 2-(1-гідроксибензил)тіаміну при взаємодії з хіноном та загальною основою

З метою прояснення механізму взаємодії хінону з С(α)-енаміном нами досліджено окиснювальний розклад 2-(1-гідроксибензил)тіаміну (VII) та його структурних аналогів (VIII-X), що є продуктами протонування інтермедіатів каталітичних тіазолій-залежних реакцій.



Константи швидкості окиснювального розкладу сполук VII-X обчислено за витрачанням хінону. При цьому за наявності ацетатного буферу константа швидкості псевдопершого порядку, що спостерігається, залежить від константи швидкості каталізу основним компонентом  $k'_2$  та константи  $k_0$ , яка враховує вклад решти реакцій, в тому числі спричинених метоксид-іонами:

$$k_1^{obs} = k_0 + k'_2 [\text{AcO}^-]$$

Із залежності  $k_1^{obs}$  від загальної концентрації буферу отримано уявну константу швидкості  $k''_2$ , а із залежності  $k''_2$  від складу буферу розраховано  $k'_2$ . При цьому з'ясувалося, що при каталізі загальною основою константа швидкості  $k'_2$  залежить не тільки від природи тіазолієвого іону, а й від природи окисника (табл. 3), незважаючи на те, що реакція має за ним нульовий порядок. Перехід від кінетики нульового порядку до кінетики першого порядку за хіноном не спо-

стерігається в широкому інтервалі концентрацій оцтової кислоти.

Таблиця 3

Константи швидкості окиснювального розкладу 2-(1-гідроксибензил)-3-R'-4-метил-5-R''-тіазолій хлоридів (VII-IX) при дії 2-метил-5-ізопропіл-1,4-бензохінону (а), триметил-1,4-бензохінону (б), тетраметил-1,4-бензохінону (в).  $\mu$  0,15, без кисню повітря, 27°C.

S	$k'_2 \cdot 10^4, M^{-1}c^{-1}$
VII	5,7±0,5 <sup>a</sup>
VII	4,6±0,4 <sup>б</sup>
VII	3,8±0,4 <sup>в</sup>
VIII	2,7±0,3 <sup>a</sup>
VIII	2,3±0,2 <sup>б</sup>
VIII	2,0±0,2 <sup>в</sup>
IX	10,5±1,4 <sup>a</sup>
IX	8,6±0,9 <sup>б</sup>
IX	7,1±1,0 <sup>в</sup>

При швидкому взятті C(α)-енаміну (S') хіноном механізм окиснювального розкладу сполук VII-IX може полягати в попередньому виникненні комплексу з окисником (S'') і його наступних перетвореннях двома шляхами: а) протонуванні та розкладу до 2-бензоїлтіазоліну; б) переходу електрону на хінон і протонуванні іон-радикальної пари S''' (схема 3). 2-Бензоїлтіазолін як інтермедіат бензоїнової конденсації (поряд з C(α)-енаміном) постулювався раніше (Doughty et al., 1987). Виходячи з стаціонарності C(α)-енаміну S' і незначного вкладу  $k_{-5}$  у початкову швидкість реакції, константу швидкості каталізу основним компонентом буферу можна подати рівнянням:

$$k'_2 = \frac{k_1 k_4 k_2 k_3 [Q][AcO^-]}{k_{-1}[AcOH] + k_2 [Q][AcO^-](k_4 k_3 + k_5)},$$

де  $k_2 = k_{-2}/k_{-1}$ . За умови, що  $k_{-1}[AcOH]/[AcO^-] \ll k_2 [Q](k_4 k_3 + k_5)$ , величина  $k'_2$  визначається співвідношенням  $k_1 k_4 k_3 / (k_4 k_3 + k_5)$ , а у випадку, коли  $k_4 k_3 \gg k_5$ , константа швидкості  $k'_2$  прагне до межі, що дорівнює  $k_1$ . Оскільки швидкість депротонування C(α)-атома залежить

від природи замісника біля четвертинного азоту тiazолію без суттєвих електронного та стеричного впливів  $\beta$ -гідроксиетильного радикалу (Stivers & Washabaugh, 1992), то відмінності констант  $k_2'$  (сполуки VIII і IX) обумовлюються зміною співвідношення  $k_5/k_4k_3$ . Для 2-(1-гідроксибензил)тіаміну (VII) та його похідних VIII, IX це співвідношення зростає зі зменшенням редокс-потенціалу хінону.

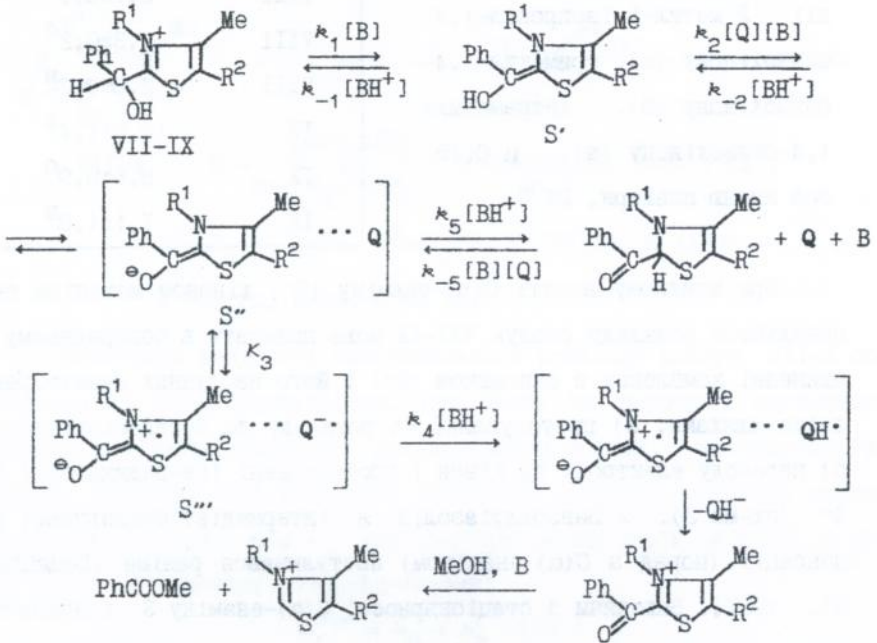


Схема 3

Отже, отримані результати узгоджуються з механізмом окиснювального розкладу 2-(1-гідроксибензил)тіазолієвого іону, що включає: перехід C( $\alpha$ )-протону на основу; утворення попереднього комплексу при взаємодії C( $\alpha$ )-енаміну з хіноном; транспорт електрону на окисник при стеричних перешкодах  $\beta$ -гідроксиетильного замісника в положенні 5 гетероциклу; протонування іон-радикальної пари; швидкий перехід наступного електрону на семіхінон.

## 2. МОДЕЛЮВАННЯ ТДФ-ЗАЛЕЖНИХ ПЕРЕТВОРЕНЬ:

### СТАДІІ, ЩО СПРИЧИНЯЮТЬ ІНГІБУВАННЯ ТІАЗОЛІЄВОГО КАТАЛІЗУ

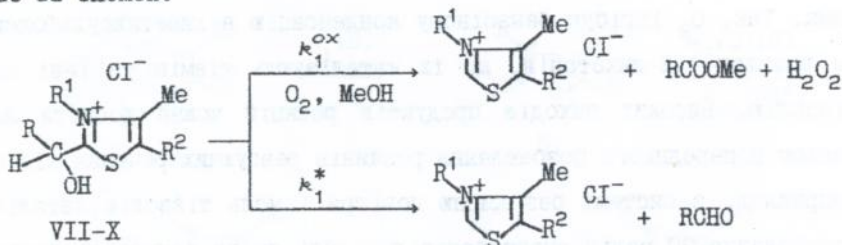
#### 2.1. Інгібування тіазолієвого каталізу молекулярним киснем

Інгібування молекулярним киснем є закономірним для каталізу тіазолієвим іоном в органічному розчиннику. Це ілюструється літературними даними (Ясников и др., 1973), а також нашими дослідженнями. Так,  $O_2$  інгібує бензоїнову конденсацію в диметилсульфоксиді та розклад 1,2-дикетонів, що їх каталізують тіамін та інші солі тіазолію. Високих виходів продуктів реакцій можна досягти лише шляхом попереднього позбавлення розчинів реагуючих речовин від  $O_2$ . Наприклад, в системі без кисню повітря 1 моль тіазолію каталізує розщеплення 30 молів ацетилбензоїлу, тоді як за наявності  $O_2$  ацетилбензоїл практично не витрачається. Для з'ясування механізму інгібування тіазолієвого каталізу  $O_2$  важливими є наступні дані.

В аеробних умовах перебіг бензоїнової конденсації чи розкладу 1,2-дикетонів супроводжується швидким поглинанням  $O_2$ . При цьому окиснення продуктів розкриття тіазолієвого циклу є незначним. Декарбоксілювання пірувату, що його каталізує тіамін, у відсутності  $O_2$  протікає з утворенням ацетоїну. В дослідах без захисту від кисню повітря ця система не забезпечує утворення ацетоїну, а лише частково продукує метилацетат. Якщо концентрації пірувату та каталізатора майже рівні, то кількість субстрату, що витрачається, є незмінною незалежно від умов дослідів. 2-(1-Гідроксиетил)тіамін в аналогічних умовах перетворюється в продукт з розкритим тіазолієвим циклом без Н-Д-обміну в С(α)-положенні. Ці дані свідчать про те, що молекулярний кисень інгібує синтез ацетоїну після стадії декарбоксілювання адукту каталізатора з піруватом, взаємодіючи з С(α)-енаміном.

2.2. Механізми розкладу 2-(1-гідроксиетил)- та  
2-(1-гідроксибензил)тіазолієвих іонів  
при взаємодії з основою та молекулярним киснем

За наявності гідроксид-іонів аеробний розклад 2- $\alpha$ -гідроксибензильних та 2- $\alpha$ -гідроксиетильного похідних тіазолію VII-X протікає за схемою:



Швидкість розкладу солей тіазолію IX-X підкоряється рівнянню псевдопершого порядку. Без кисню повітря  $k_1^{obs}$  дорівнює константі швидкості  $k_1^*$ . За аеробних умов  $k_1^{obs} = k_1^* + k_1^{ox}$ . 2-(1-гідроксиетил)-3-бензил-4-метилтіазолій хлорид (X) розкладається на ацетальдегід і сіль тіазолію з порівняно низькою швидкістю, тобто практично за наявності кисню повітря  $k_1^{obs} = k_1^{ox}$ . Відмінності величин  $k_1^{ox}$  в реакціях розкладу 2- $\alpha$ -гідроксибензильного (IX) і 2- $\alpha$ -гідроксиетильного (X) похідних тіазолію пояснюються індуктивним впливом C( $\alpha$ )-замісників на стадії переходу протону на основу. Нелінійні залежності  $k_1^{ox}$  розкладу сполук IX, X від концентрації лугу, які отримано експериментально, свідчать про те, що реакційноздатним щодо  $O_2$  може бути іонізований C( $\alpha$ )-енамін.

Каталіз загальною основою не супроводжується паралельним розривом C(2)-C( $\alpha$ )-зв'язку, тобто константа швидкості перетворення сполук VII-IX є константою  $k_1^{ox}$ , що описується рівнянням:

$$k_1^{ox} = k_o + k_b [AsO^-],$$

де  $k_b$  - константа швидкості реакції, що її каталізує ацетат, а  $k_o$  - константа швидкості окиснювального розкладу в інших реакціях, в тому числі залежних від концентрації метоксид-іону.

Згідно рівняння стаціонарної швидкості для  $S'$  (схема 4) величина  $k_b$  відповідає виразу:

$$k_b = \frac{k_1 k_2 [\text{AcO}^-][\text{O}_2]}{k_{-1} [\text{AcOH}] + k_2 [\text{AcO}^-][\text{O}_2]}$$

Якщо  $[\text{AcO}^-] \gg [\text{AcOH}]$ , то швидкість протонування  $C(\alpha)$ -енаміну може бути меншою, ніж його взаємодія з молекулярним киснем. При  $k_2 [\text{O}_2] \gg k_{-1} [\text{AcOH}]/[\text{AcO}^-]$  швидкість реакції буде лімітуватися утворенням  $C(\alpha)$ -енаміну і  $k_b = k_1$ . В значному інтервалі концентрацій кислоти швидкість аеробного розкладу сполук VII-IX може визначатися окисненням іонізованого  $C(\alpha)$ -енамінного інтермедіату. При цьому  $k_b = k_1 k_2 [\text{O}_2][\text{AcO}^-]/[\text{AcOH}]$ , де  $k_1$  - константа рівноваги на стадії утворення  $C(\alpha)$ -енаміну.

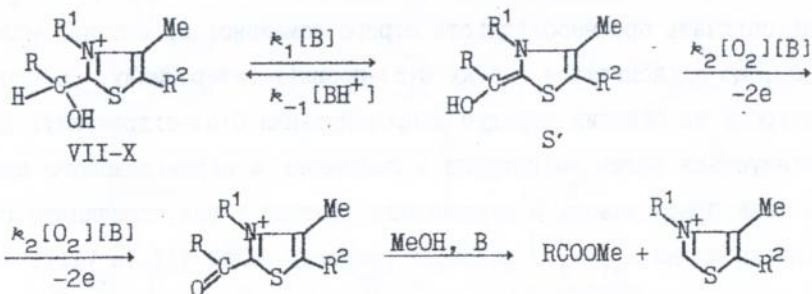


Схема 4

Із залежностей  $1/k_b$  від  $[\text{AcOH}]/[\text{AcO}^-]$  можна розрахувати константи швидкості  $k_1$  та співвідношення  $k_{-1}/k_2$ . З'ясувалося, що для 2-(1-гідроксибензил)тіаміну (VII) та сполук VIII-IX ці величини визначаються природою замісників у положеннях 3 та 5 тіазолієвого циклу (табл. 4).

Індуктивний вплив бензильного замісника в положенні 3 тіазолію забезпечує рівні величини  $k_1$  розкладу сполук VIII та IX. Для похідних тіазолію VII, VIII величини  $k_1$  корелюють з параметрами Гаммета для 2-метил-4-амінопіримідиніл-5-метильного та бензильного замісників.

Співвідношення  $k_{-1}/k_2$  характеризує розподіл C( $\alpha$ )-енаміну поміж протонуванням та окисненням і, очевидно, визначається константою швидкості  $k_2$ . Причиною значного збільшення співвідношення  $k_{-1}/k_2$  (розклад солі VIII) можуть бути стеричні перепони  $\beta$ -гідроксисетильного замісника на стадії взаємодії C( $\alpha$ )-енаміну з  $O_2$ . Ці дані свідчать про необхідність строго обмеженої орієнтації молекули  $O_2$ , що здійснюється з боку C(5)-позиції гетероциклу. Транспорту електрону на окисник передує депротонування C( $\alpha$ )-гідроксилу. З цим пов'язується вплив аміногрупи в положенні 4 піримідинового циклу, яка може брати участь в перенесенні протону і тим спричиняти різні співвідношення  $k_{-1}/k_2$  в реакціях розкладу солей VII та VIII.

Константи швидкості розкладу сполук VII-IX при взаємодії з ацетатом і  $O_2$ . Метанол, 25°C,  $\mu$  0,15.

Сіль тіазолію	$k_1 \cdot 10^3, M^{-1}c^{-1}$	$k_{-1}/k_2, M$
VII	1,56±0,10	0,48±0,06
VIII	0,91±0,12	7,52±0,91
IX	0,91±0,07	0,61±0,05

### 2.3. Тіазолієві катіон-радикали

Нами встановлено, що за аеробних умов розклад 2-(1-гідроксибензил)тіаміну (VII) та його структурних тіазолієвих аналогів VIII-IX супроводжується утворенням вільних радикалів, які можна реєструвати методом ЕПР. Сигнал не зафіксовано за відсутності основи, а його інтенсивність зростає зі збільшенням концентрації  $O_2$ .

Аналогічні спектри отримано під час перебігу бензоїнової конденсації внаслідок взаємодії тіаміну та солей тiazолію II, IV з бензальдегідом, основою та молекулярним киснем. Очевидно, що попередником у механізмі утворення вільних радикалів є адукт солі тiazолію з бензальдегідом. Якщо одноелектронному окисненню підпадає іонізований С(α)-енамін S'' і швидкість протонування радикального інтермедіату близька до швидкості переходу наступного електрону на окисник, то утворюються побічні в каталізі радикали (схема 5), похідні енолу або 2-бензоїлтiazоліну. Розщеплення в спектрах ЕПР (табл. 5), що реєструються при використанні тіаміну і солей тiazолію різної природи, відповідають структурам XI-XVIII.

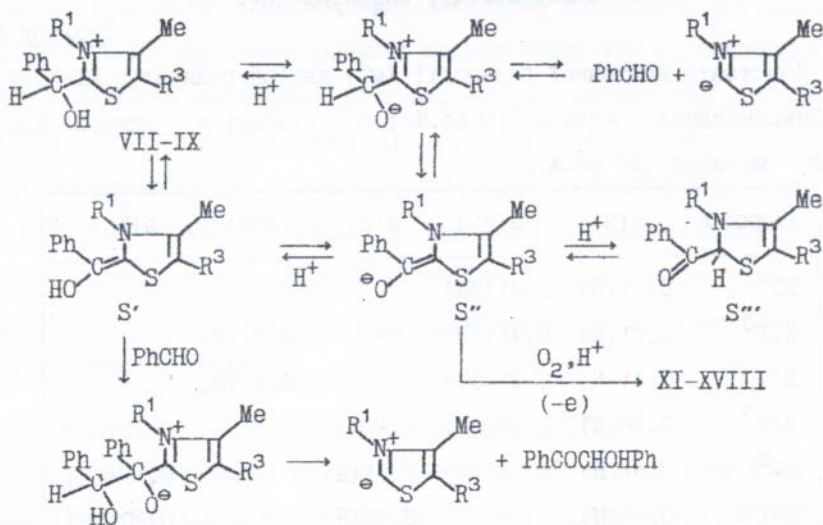
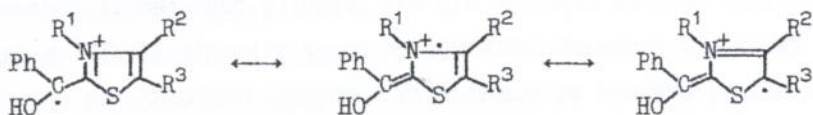


Схема 5

В катіон-радикалах тiazолію XI-XIV неспарений електрон взаємодіє з ядром азоту та протонами, наближеними до положень 3 та 5. Вклад граничної структури з електроном поза гетероциклом, е, очевидно, малим. Будова радикалів XI-XIV може визначатися наявністю



$R^1 = \text{Me}$  (XI-XIV);  $R^2 = \text{Ph}$  (XI, XII), Me (XIII-XIV);

$R^3 = \text{Ph}$  (XI), H (XII, XIII), Me (XIV)



$R^1 = \text{Me}$  (XV, XVII),  $\text{PhCH}_2$  (XVI, XVIII);

$R^2 = \text{H}$  (XVII, XVIII),  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  (XV, XVI)

Таблиця 5

Константи надтонкої взаємодії (mT) катіон-радикалів XI-XVIII.

$\alpha$  - Гексаметапол - етанол (10 об.%);  $\sigma$  - етанол;  $\beta$  - диметилсульфоксид - метанол (20 об.%).

Радикал	$a(N)$	$a(3')$	$a(2)$	$a(5)$	$a(5')$
XI <sup>A</sup>	0,41 (N)	0,41 (3H)	-		
XII <sup>O</sup>	0,41 (N)	0,41 (3H)	-	0,21 (H)	
XIII <sup>O</sup>	0,41 (N)	0,41 (3H)	-	0,41 (H)	
XIV <sup>O</sup>	0,46 (N)	0,46 (3H)	-		0,23 (3H)
XV <sup>B</sup>	0,51 (N)	-	0,51 (H)		0,17 (2H)
XVI <sup>B</sup>	0,47 (N)	-	0,47 (H)		0,20 (2H)
XVII <sup>B</sup>	0,25 (N)	-	0,25 (H)	0,96 (H)	
XVIII <sup>B</sup>	0,25 (N)	-	0,25 (H)	1,00 (H)	

метильної групи в положенні 3 гетерокільця, на відміну від сполук XV-XVIII, що мають біля четвертинного атома азоту бензильний або 2-метил-4-амінопіримідинілметильний замісник. У випадку радикалів

XV-XVIII неспарений електрон взаємодіє з ядром азоту та протонами біля C(2)- та C(5)-атомів гетероциклу.

Отже, іонізований C( $\alpha$ )-енамін S'', що є інтермедіатом таутомерних перетворень між S' та S''' (схема 5), може піддаватися одноелектронному окисненню. Це свідчить про те, що перетворення C( $\alpha$ )-енаміну в 2-бензоільне похідне тiazолію відбувається за радикальним механізмом. Побічні вільнорадикальні перетворення C( $\alpha$ )-енаміну S'' спричинятимуть витрачання каталізатора та інгібування тiazолієвого каталізу молекулярним киснем.

Реакційну здатність аніон-радикалу кисню щодо тіаміну ілюструють результати його електрохімічного відновлення в диметилформаміді на дисковому золотому амальгамованому електроді, що обертався. Послідовне насичення розчину киснем приводить до зменшення, а потім і повного зникнення граничних струмів першої ( $E_{1/2} = -1,36$  В, тiazолієвий) і другої хвилі ( $E_{1/2} = -1,52$  В, піримідинієвий цикл) гідрохлориду тіаміну. Закономірності, що спостерігаються і при наступній зміні умов дослідів, узгоджуються з нуклеофільним приєднанням аніон-радикалу кисню в положення 2 тiazолієвого та 6 піримідинієвого циклів, що має супроводжуватися втратою каталітичних властивостей вітаміну B<sub>1</sub>.

#### 2.4. Сольватація іону тiazолію

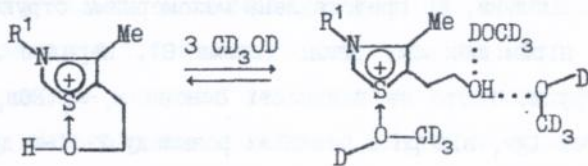
Під час модельних хімічних перетворень тiazолієвий цикл забезпечує делокалізацію C( $\alpha$ )-карбаніонного заряду (Breslow, 1958). Слід зазначити, що електроноакцепторні властивості іону тiazолію можуть відігравати певну роль і на інших стадіях каталізу (Ясников и др., 1973). З метою з'ясування механізмів модельного впливу  $\pi$ -донорного розчинника нами досліджено сольватацію солей тiazолію метанолом в дейтерохлороформі.

Якщо до розчину 3-бензил-4-метилтіазолій хлориду (IV) в  $\text{CDCl}_3$  додати два еквіваленти  $\text{CD}_3\text{OD}$ , то в спектрах ПМР сигнал С(2)-протону переміщується в бік сильніших полів приблизно на 0,2 м. д., а величини хімічних зсувів С(5)-Н і  $\text{N-CH}_2$  залишаються без змін. На відміну від хлориду 3-бензил-4-метилтіазолію, вплив  $\text{CD}_3\text{OD}$  на хімічний зсув С(2)-протону 3-бензил-4-метилтіазолій йодиду не такий значний. При дії  $\text{CD}_3\text{OD}$  на ці похідні тіазолію змінюється і мультиплетність сигналу С(2)-протону. В  $\text{CDCl}_3$  він є дублетом, за наявності метанолу реєструється як мультиплет, а зі збільшенням концентрації метилового спирту - знову як дублет.

Взаємодію  $\text{CD}_3\text{OD}$  з іоном тіазолію, що спричиняє такі зміни хімічних зсувів та форми сигналів С(2)-протонів, не можна пояснити утворенням водневих зв'язків за участю С(2)-Н, чи розкладом можливих іонних асоціатів. До того ж С(α)-протон 2-(1-гідроксибензил)-3-бензил-4-метилтіазолій хлориду, що у відсутності основи в метанолі не обмінюється, за наявності двох еквівалентів  $\text{CD}_3\text{OD}$ , на противагу відповідному йодидові, також реєструється в більшому полі, зсуваючись приблизно на 0,05 м. д. Очевидно, сольватація катіону тіазолію пов'язана з донорно-акцепторною взаємодією неподіленої електронної пари атома кисню сольватуючого агента з атомом сірки тіазолієвого циклу, що має частину позитивного заряду (Jordan, 1974). Внаслідок такої взаємодії збільшується електронна густина в гетероциклі та екранування протону в положенні 2, що змінює його хімічний зсув і може зменшувати швидкість утворення іліду.

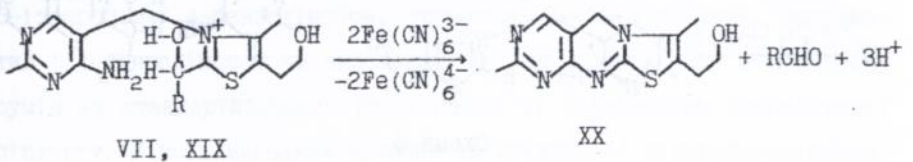
Наявність замісника в С(5)-положенні 3-бензил-4-метил-5-(2-гідроксиетил)тіазолій хлориду (II) зумовлює реєстрацію сигналу С(2)-протону в сильнішому полі щодо хімічного зсуву С(2)-протону 3-бензил-4-метилтіазолій хлориду (IV). Однак цього не відбуваєть-

ся, якщо С(5)-замісником є метильна група, або у випадку йодиду 3-бензил-4-метил-5-(2-гідроксиетил)тіазолію. Ці дані свідчать про можливість внутрішньомолекулярної донорно-акцепторної взаємодії між атомом кисню β-гідроксиетильної групи та атомом сірки тіазолієвого циклу 3-бензил-4-метил-5-(2-гідроксиетил)тіазолій хлориду. При переході від 3-бензил-4-метилтіазолій хлориду до 3-бензил-4-метил-5-(2-гідроксиетил)тіазолій хлориду вигляд залежності Δδ від концентрації метанолу з гіперболічної змінюється на S-подібну. При дії метанолу змінюється і мультиплетність сигналу OCH<sub>2</sub>-протонів 3-бензил-4-метил-5-(2-гідроксиетил)тіазолій хлориду, що рееструються замість дублету триплетів як триплет. Отже, можливий механізм сольватації включає на перших стадіях утворення водневих зв'язків, а в наступних - взаємодію сольватуючого агента з тіазолієвим циклом:



2.5. Механізми взаємодії 2-(1-гідроксиетил)тіаміну з фериціанідом

Фериціанідний метод визначення активності ТДФ-залежного ферменту не завжди може включати безпосередню паракаталітичну взаємодію нефізіологічного окисника з кофермент-субстратним адуктом. Аналіз кінетичних даних окиснювального розкладу 2-(1-гідроксиетил)тіаміну (XIX) у воді до каталітично неактивного тіохрему (XX)



VII, XIX

XX

свідчить, що константа швидкості псевдопершого порядку при концентраціях фероціаніду калію, що додавався в реакційну суміш у надлишку, прямо пропорційна концентрації окисника. Збільшення концентрації фероціаніду викликає зменшення  $k_1^{obs}$ . При незмінній початковій концентрації окисника залежність  $1/k_1^{obs}$  від концентрації фероціаніду є лінійною. Отже, окиснення 2-(1-гідроксиетил)тіаміну, що його інгібує фероціанід, є принаймні двостадійним з утворенням проміжної сполуки. Для двостадійного перебігу

$$k_1^{obs} = k_1 k_2 C_1 / (k_{-1} C_{-1} + k_2),$$

де  $k_1$  і  $k_2$  - константи швидкості першої та другої стадій,  $k_{-1}$  - константа швидкості відновлення проміжної сполуки, а  $C_1$  і  $C_{-1}$  - концентрації фероціаніду і фероціаніду калію, відповідно. Отримані  $k_1$  зростають зі збільшенням рН. Очевидно, утворенню проміжної радикальної сполуки, що представлена мезомерними структурами з електроном в піримідиновому циклі (схема 6), передують депротонування 4'-аміногрупи, тобто за наявності основи  $k_1 = k_1'$  ( $\Sigma C B_i$ ). Порівняння залежностей  $\lg k_1$  від рН в реакціях розкладу 2-(1-гідроксиетил)тіаміну та 2-(1-гідроксибензил)тіаміну вказує на те, що при низьких концентраціях гідроксид-іонів індуктивний ефект фенільної чи ме-

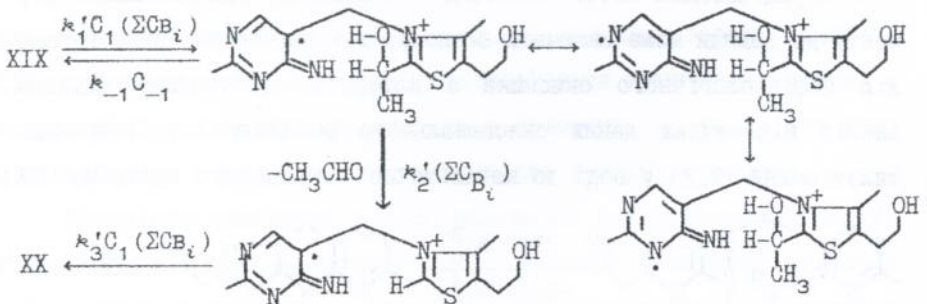


Схема 6

тильної групи стабілізує проміжний продукт, який утворюється в результаті депротонування аміногрупи. При зростанні рН цей ефект проявляється на стадії переходу одного електрону. Наступна стадія окиснення фериціанідом не лімітує загальну швидкість реакції.

Наведені механізми за участю окисника моделюють швидкий розрив C(2)-C(α)-зв'язку адукту ТДФ з субстратом у полярному оточенні. Така модель каталізу потребує наявності як окиснювального, так і відновлювального центрів ферменту.

### 3. МЕХАНІЗМИ ПАРАКАТАЛІТИЧНИХ ПЕРЕТВОРЕНЬ

#### ДРІЖДЖОВОЇ ПІРУВАТДЕКАРБОКСИЛАЗИ

##### 3.1. Інактивація дріжджової піруватдекарбоксілази

##### при взаємодії з субстратом та молекулярним киснем чи хіноном

Результати модельних досліджень свідчать про можливість паракаталітичних взаємодій ТДФ-залежного ферменту, якщо його реакційноздатний інтермедіат доступний для екзогенного хінону чи молекулярного кисню. Перетворення дріжджової піруватдекарбоксілази у відсутності субстрату можуть супроводжуватися модифікацією істотних для каталізу сульфгідрильних груп (Dyda et al., 1993), проте піруват запобігає впливові сульфгідрильних реагентів (Schellenberger, 1968). Разом з тим з'ясувалося, що при спільній дії пірувату та екзогенного окисника - заміщеного хінону або молекулярного кисню - відбувається незворотна інактивація дріжджової піруватдекарбоксілази. Залишкова активність ферменту після інкубації з 2-метил-5-ізопропіл-1,4-бензохіноном, триметил-1,4-бензохіноном, тетраметил-1,4-бензохіноном чи екзогенним O<sub>2</sub>, що пропускався в реакційну суміш за стандартизованих умов, падає зі збільшенням концентрації пірувату. У всіх випадках активність дріжджової піруватдекарбоксі-

лази не відновлювалася після її витримання з надлишком дитіотреїтолу, хлористого магнію і ТДФ та наступної гель-фільтрації на сефадексі G-25.

Кінетика інактивації дріжджової піруватдекарбоксилази за наявності субстрату ( $[S] \gg K_M$ ) та екзогенного хінонового окисника характеризується псевдомомолекулярними закономірностями. Константи швидкості інактивації, що спостерігаються, можуть визначатися концентраціями субстрату, заміщеного хінону та величиною рН. Залежність  $k_1^{obs}$  інактивації, спричиненої 2-метил-5-ізопропіл-1,4-бензохіноном, від концентрації пірувату має гіперболічний вигляд. У випадку активнішого метил-1,4-бензохінону та при низьких концентраціях пірувату деякий вклад в константу швидкості можуть вносити окисно-відновні перетворення вільного холоферменту. Залежність константи швидкості інактивації, що спостерігається, від рН за наявності субстрату і 2-метил-5-ізопропіл-1,4-бензохінону характеризується максимумом в області 5,9-6,0, що є оптимальним для каталізу дріжджовою піруватдекарбоксілазою. Це вказує на спільність окремих стадій у механізмах ферментативного каталізу та інактивації піруватдекарбоксілази за наявності субстрату і заміщеного хінону. При збільшенні концентрації окисника та для менш активного тетраметил-1,4-бензохінону чи молекулярного кисню подібні залежності можуть характеризуватися максимальною інактивацією в діапазоні рН 6-7.

Порядок інактивації за окисником змінюється від першого до нульового зі збільшенням концентрації заміщеного хінону. Цей перехід залежить від рН та природи хінону і відбувається при менших концентраціях окисника зі збільшенням його редокс-потенціалу. Причиною від'ємних відхилень в кореляціях між  $k_1^{obs}$  та концентраціями

заміщеного хінону є зміна стадії, що лімітує швидкість принаймні двостадійного перебігу окиснення. При низькій концентрації хінону швидкість інактивації дріжджової піруватдекарбоксилази прямо пропорційна концентрації окисника. При підвищенні концентрації заміщеного хінону відбувається швидке утворення інтермедіату окисно-відновних перетворень, а швидкість інактивації ферменту визначається перебігом наступних стадій.

Отримані кінетичні дані свідчать про паракаталітичний механізм інактивації дріжджової піруватдекарбоксилази, згідно якого хінон взаємодіє з проміжною сполукою ферментативного декарбоксування пірувату. Таким інтермедіатом, за аналогіями з даними модельних хімічних досліджень, є "активний ацетальдегід", що утворюється після розриву  $C(\alpha)-C(\beta)$ -зв'язку кофермент-субстратного адукту. Перетворення "активного ацетальдегіду" при дії хінону чи молекулярного кисню до 2-ацетильного похідного ТДФ вимагає формального переходу двох електронів на молекулу окисника. Це б забезпечило реалізацію паралельних каталітичних окисно-відновних перетворень, оскільки гідроліз 2-ацетильного похідного в активному центрі дріжджової піруватдекарбоксилази протікає зі швидкістю, яку можна порівняти зі швидкістю відокремлення ацетальдегіду в звичайній реакції (Gish et al., 1988). Проте експериментальні дані свідчать, що, на відміну від модельних хімічних перетворень, заміщені хінони не витрачаються як субстрати окисно-відновного ТДФ-залежного каталізу в системі, що вміщує дріжджову піруватдекарбоксилазу та піруват. Очевидно, окиснення "активного ацетальдегіду" заміщеним хіноном або молекулярним киснем зупиняється на проміжних стадіях з утворенням продуктів, які за даних умов не можуть регенерувати активний холофермент.

### 3.2. Механізми паракаталітичної інактивації

#### дріжджової піруватдекарбоксілази

#### при взаємодії з хіноновими акцепторами електронів

Функціонування дріжджової піруватдекарбоксілази за наявності субстрату і хінону включає стадію декарбоксілювання 2-(1-карбокси-1-гідроксиетил)-ТДФ, зв'язаного з ферментом, до "активного ацетальдегіду", що потім взаємодіє з окисником або ж протонується за звичайним каталітичним механізмом. Тетраедральний продукт протонування розкладається в наступному з відокремленням вільного ацетальдегіду. Окиснення "активного ацетальдегіду" може зупинятися на проміжній стадії з утворенням тiazолієвого катіон-радикалу, що подається рядом граничних мезомерних структур, та вільного семихінону (схема 7).

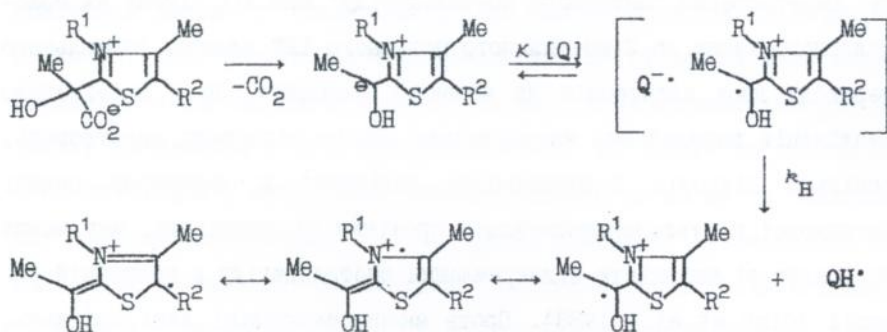


Схема 7

При надлишкових концентраціях субстрату константа швидкості інактивації, що спостерігається, описується рівнянням:

$$k_1^{obs} = k_H K [Q] / (1 + K [Q])$$

За умови, що  $K[Q] \ll 1$ , виконується рівність  $k_1^{obs} = k_2 [Q]$ , де  $k_2 = k_H K$ . Якщо  $K[Q] \gg 1$ , то  $k_1^{obs}$  дорівнює константі  $k_H$ , яка залежить від концентрації протонів. Константи швидкості паракаталітичної

інактивації другого порядку  $k_2$  розраховано з лінійної залежності  $1/k^{obs}$  від  $1/[Q]$  (табл. 6).

Таблиця 6

Константи швидкості інактивації дріжджової піруватдекарбоксілази за наявності субстрату та хінонових акцепторів електронів. 0,05 М фосфатний буфер, рН 6,0, 25<sup>0</sup>С.

Хінон	$k_2, M^{-1} s^{-1}$
1,4-бензохінон	$(6,7 \pm 0,7) \cdot 10$
метил-1,4-бензохінон	$(6,7 \pm 0,6) \cdot 10$
2,5-диметил-1,4-бензохінон	$(3,9 \pm 0,3) \cdot 10$
триметил-1,4-бензохінон	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10$
тетраметил-1,4-бензохінон	$2,3 \pm 0,2$
2-метил-5-ізопропіл-1,4-бензохінон	$(6,8 \pm 0,4) \cdot 10$
убіхінон-9	$2,7 \pm 0,3$
1,4-нафтохінон	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10$
2-метил-1,4-нафтохінон	$6,7 \pm 0,9$

Згідно теорії зовнішньосферного переносу електрону (Marcus, 1965), швидкість окисно-відновного процесу визначається різницею редокс-потенціалів реагентів  $\Delta E$ , кількістю електронів  $n$ , що переносяться, та константами внутрішнього обміну електронами  $k_{11}$  і

$$k_{22}^{\cdot}: \quad \lg k_{12} = 8,4 n \Delta E + 0,51 \lg(k_{11} k_{22})$$

Для ряду хінонів з однаковими величинами  $k_{11}$  і  $k_{22}$  коефіцієнт пропорційності в залежності  $\lg k_{12}$  від  $\Delta E$  становить величину 8,4 л. Тангенс кута нахилу експериментальної залежності  $\lg k_2$  від величини потенціалу одноелектронного відновлення  $E_0(Q/Q^{\cdot-})$  в ряду хінонових окисників від тетраметил-1,4-бензохінону до 2-метил-5-ізо-

пропіл-1,4-бензохінону задовільно відповідає коефіцієнтові 8,4. Необхідно зауважити, що величини  $k_2$  для 1,4-нафтохінону та 2-метил-1,4-нафтохінону корелюють з їх редокс-потенціалами, а при використанні убіхінону-9 ця константа близька до  $k_2$  за наявності тетраметил-1,4-бензохінону. Отримані дані свідчать, що загальна швидкість паракаталітичної інактивації піруватдекарбоксилази може визначатися стадіями одноелектронного відновлення хінону до семихінону. Контроль швидкості одноелектронного окиснення "активного ацетальдегіду" не є результатом стеричних перешкод з боку ферменту на стадіях, що передують взаємодії окисника з інтермедіатом ферментативного каталізу.

Виходячи з цього, інактивація піруватдекарбоксилази може бути спричинена перетвореннями радикального кофермент-субстратного інтермедіату, що не приводять до регенерації холоферменту, або ж реакціями вільного семихінону, який взаємодіє з найближчим білковим оточенням. Щоб встановити одну з можливостей, яка ініціює незворотні зміни, нами досліджено інактивацію ферменту за наявності пірувату в окиснювальній системі заміщений хінон - фериціанід калію. Вибір фериціаніду обумовлено передусім гідрофобністю активного центру дріжджової піруватдекарбоксилази, що значною мірою не сприяє безпосередньому контактowi "активного ацетальдегіду" з гідрофільним комплексним аніоном.

З'ясувалося, що константи швидкості інактивації піруватдекарбоксилази за наявності субстрату та окиснювальної системи заміщений хінон - фериціанід зменшуються зі збільшенням концентрації фериціаніду. Характер залежностей  $k_1^{obs}$  від концентрації фериціаніду свідчить, що протекторна дія останнього зростає в ряду хінонових окисників: 2,5-диметил-1,4-бензохінон, триметил-1,4-бензохі-

нон, тетраметил-1,4-бензохінон. Вигляд рН-залежностей  $k_1^{obs}$  інактивації піруватдекарбоксилази в системі заміщений хінон - фериціанід позбавлений характерних максимумів при рН 5,9-6,0, а вплив концентрації пірувату незначний. У можливному механізмі спільної дії двох окисників на каталіз дріжджовою піруватдекарбоксилазою обидві стадії одноелектронного переходу від "активного ацетальдегіду" здійснюються за участю заміщеного хінону, а фериціанід окиснює семихінонові радикали, що утворюються (схема 8).

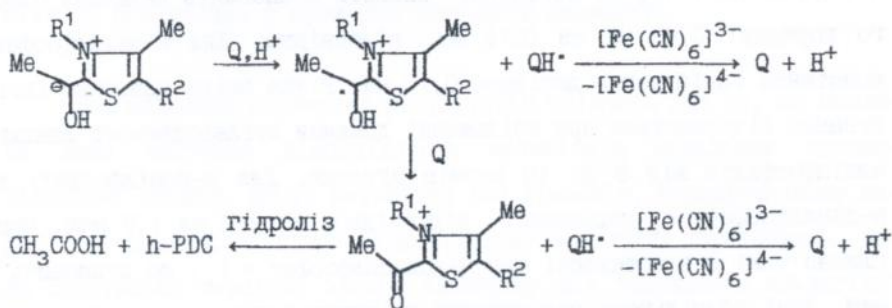


Схема 8

Таким чином, залежно від природи хінону в окиснювальній системі заміщений хінон - фериціанід відбувається або інактивація піруватдекарбоксилази, або поряд з цим часткова трансформація її функції в піруватоксидазну, тобто збереження активності з розподілом потоків неокиснювального та окиснювального декарбоксилювання. Організація активного центру дріжджової піруватдекарбоксилази забезпечує відносну стабільність проміжного "активного ацетальдегіду", його доступність для екзогенної молекули хінону та реалізацію механізму протонування іон-радикальної пари, що утворюється. Тіазолієвий катіон-радикал все ж здатний до наступного окиснення екзогенною сполукою, проте реакції семихінонів спричиняють незворотні зміни суттєвих для каталізу функціональних груп.

### 3.3. Формування активного центру, що утруднює перехід протону

Відмінності перебігу паракаталітичних перетворень дріжджової піруватдекарбоксілази у порівнянні з даними хімічного моделювання визначаються особливостями середовища. З метою аналізу гідрофобного впливу в активному центрі дріжджової піруватдекарбоксілази нами досліджено її інгібування алкілфосфатами. Механізм інгібування є конкурентним щодо субстрату. Константи інгібування *n*-бутиловим та *n*-гептиловим естерами фосфорної кислоти становлять величини одного порядку: 0,40 мМ та 0,16 мМ, відповідно. Для *n*-октилфосфату константа інгібування дорівнює 0,10 мМ. Різка зміна констант інгібування відбувається при збільшенні довжини вуглеводневого ланцюга алкілфосфатів від 9 до 10 атомів вуглецю. Для *n*-нонілфосфату та *n*-децилфосфату  $K_i$  дорівнюють, відповідно, 39 мкМ та 1,7 мкМ. Приблизно такі ж властивості має *n*-додецилфосфат з  $K_i$ , що становить 2 мкМ. Дані обопільного гальмування дріжджової піруватдекарбоксілази *n*-дециловим естером фосфорної кислоти та неорганічним фосфатом ( $K_i$  2,6 мМ), свідчать про їх взаємне виключення.

Виходячи з цього та характеру залежності  $pK_i$  від числа атомів вуглецю інгібітора, можна зробити висновок, що на поверхні холопіруватдекарбоксілази є щонайменше дві гідрофобні ділянки. Одна з них розташована в центрі зв'язування субстрату, сприяючи його закріпленню. Інша гідрофобна ділянка більш віддалена і не може відігравати істотної ролі в механізмі зв'язування пірувату. Можливо, що гідрофобна ділянка за межами зв'язування субстрату причетна до формування оточення, що утруднює перехід протону в процесі взаємодії хінону з "активним ацетальдегідом". Про це свідчать дані дослідження паракаталітичної інактивації піруватдекарбоксілази у розчинах, що вміщували 1,0 - 13,5 об.% метанолу. В інтервалі рН

5,8-6,4 константа швидкості інактивациі, що спостерігається, різко знижується з підвищенням концентрації метанолу від 4 до 7 об. % (Z-подібна залежність з величинами  $k_1^{obs}$  на плато близько  $12 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$  та  $6 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ ). Зниження  $k_1^{obs}$  не залежить від порядку входження хінону в кінетичне рівняння інактивациі. Як свідчить характер залежностей  $1/k_1^{obs}$  від  $1/[Q]$ , зміна  $k_1^{obs}$  спричинена зниженням константи швидкості  $k_H$ , що може обумовлюватись зменшенням мікроскопічної діелектричної проникності в результаті взаємодії органічного розчинника з активною поверхнею ферменту.

Узагальнення отриманих результатів свідчить про те, що можлива лише часткова відповідність механізмів модельних окисно-відновних стадій, що їх каталізує іон тiazолію, механістичному перебігові паракаталітичних піруватдекарбоксилазних перетворень. Воно стосується переходу одного електрону від "активного альдегіду" на хінон та наступного протонування іон-радикальної пари. Відмінності механістичного перебігу модельного окисно-відновного каталізу та паракаталітичних перетворень дріжджової піруватдекарбоксилази витікають, передусім, з різної природи "активного альдегіду". Якщо у випадку хімічного каталізу відбувається швидка делокалізація негативного заряду в тiazолієвому циклі з утворенням енамінної структури (Stivers & Washabaugh, 1992), то під час піруватдекарбоксилазних взаємодій "активний ацетальдегід" є, ймовірно, C( $\alpha$ )-карбаніоном (Kluger, 1987). Інші суттєві відзнаки привносить ферментативна стадія депротонування C( $\alpha$ )-гідроксилу, в якій беруть участь аміногрупа коферменту та протонодонорна група білка поблизу N(1')-атому ТДФ (Schellenberger, 1990). Очевидно, під час паракаталітичних перетворень "активного ацетальдегіду" і просторових

змін, спричинених утворенням комплексу з хіноїдною структурою, ферментативний механізм протонування C(α)-карбаніону порушується. В подальшому, в результаті появи неспареного електрону та його делокалізації в тiazолієвому циклі стає неможливою і злагоджена ферментативна система транспорту протону від C(α)-гідроксилу на протонаакцепторний залишок білка за участю 4'-іміногрупи, без чого не відбувається перехід наступного електрону від тiazолієвого катіонрадикалу на окисник (схема 9). Це й обумовлює, на відміну від модельного хімічного каталізу, вихід семихінону з "клітки" та його реакції, що пов'язані з інактивацією ферменту.

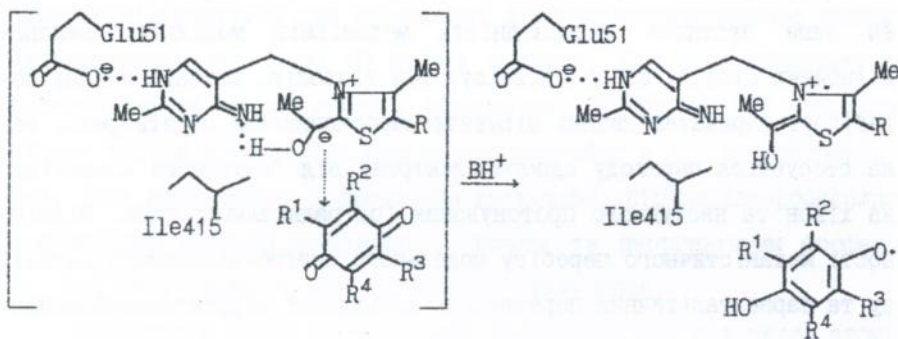


Схема 9

На основі аналізу одержаних даних та з огляду на важливу роль кисню в живій клітині і токсичність хінонів можна прогнозувати вплив паракаталітичних стадій на механізми функціонування ТДФ-залежних ферментів. Наша гіпотеза полягає в тому, що зниження активності мультиферментного піруватдегідрогеназного комплексу є наслідком паракаталітичних взаємодій піруватдекарбоксілазного компоненту з O<sub>2</sub> або іншими сполуками, в тому числі хінонами, що потрапляють до клітини через лікарські засоби чи внаслідок хімічного забруднення довкілля. Зокрема, в оточенні, що утруднює транспорт

протону від С( $\alpha$ )-гідроксильної групи "активного ацетальдегіду", його окиснення хіноновим ксенобіотиком або  $O_2$  зупинятиметься на стадіях після переходу одного електрону від інтермедіату ферментативної реакції на окисник. Це спричинятиме утворення радикальних продуктів та повільну регенерацію холоферменту або втрату активності піруватдекарбоксілази.

#### 4. ДОДАТОК. БІОМІМЕТИКА ГІДРОФОБНИХ ВЗАЄМОДІЙ ТІАМІНУ І ТДФ

Аналізуючи роль структурних фрагментів молекули вітаміну  $B_1$  і тіамінфосфатів в процесі реалізації їх біологічної активності, ми допустили, що функція 4-аміно-2-метилпіримідиніл-5-метильного замінника може бути "якірною" завдяки механізмам гідروفобних взаємодій. Як модельні досліджено закономірності реконструкції дріжджової холопіруватдекарбоксілази за наявності N-алкілзаміщених похідних тіазолію. З'ясувалося, що 3-алкіл-4-метил-5- $\beta$ -гідроксиетилтіазолієві солі за малих концентрацій можуть зворотно зв'язуватись в активному центрі апоферменту. При підвищенні їх концентрації відбувається незворотна інактивація піруватдекарбоксілази з константами швидкості, що пропорційні довжині вуглеводневого ланцюга. Виходячи з ролі гідروفобних взаємодій як важливого фактору в біоміметиці тіаміну та ТДФ, нами синтезовано ряд N-алкілоксикарбонілметильних похідних тіазолію. Їх біологічна активність залежить від природи алкільного радикалу. Перспективними для подальшого вивчення є 3-децоксикарбонілметил-4-метил-5- $\beta$ -гідроксиетилтіазолій хлорид та 3-децоксикарбонілметил-4-метилтіазолій хлорид, що ефективно блокують нервово-мускульну передачу та виявляють транквілізуючі властивості. Ці сполуки здатні інгібувати поглинання ( $^{14}C$ )-тіаміну синаптичними мембранами головного мозку щурів.

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено закономірності та з'ясовано механізми каталітичної дії солей тiazолію, що не заміщені в положенні 2, в модельних реакціях окиснення альдегідів та окиснювального розкладу пірвіноградної кислоти при взаємодії з хінонами, а також окиснювального розкладу 1,2-дикетонів. Проміжними в каталізі є іонізовані C( $\alpha$ )-енаміни, що утворюються після переходу C( $\alpha$ )-протону на основу або розриву C( $\alpha$ )-C( $\beta$ )-зв'язку ковалентних адуктів субстрату з каталізатором. Швидкість окисно-відновних перетворень залежить від редокс-потенціалу окисника та індуктивного впливу замісника в положенні 3 тiazолію.  $\beta$ -Гідроксиетильна група в положенні 5 тiazолієвого циклу каталізатора може створювати стеричні перешкоди.

2. Встановлено кінетичні закономірності окиснювального розкладу 2-(1-гідроксибензил)тіаміну та його тiazолієвих аналогів при взаємодії з основою та молекулярним киснем. Перехід електронів на O<sub>2</sub> від проміжного іонізованого C( $\alpha$ )-енаміну конкурує з його протонуванням. Окисненню сприяє наявність 4'-аміногрупи 2-(1-гідроксибензил)тіаміну і певна орієнтація молекули O<sub>2</sub>, що може порушуватись внаслідок стеричного впливу  $\beta$ -гідроксиетильного замісника в положенні 5 тiazолію.

3. Ідентифіковано вільні радикали, що за наявності основи супроводжують аеробний розклад 2-(1-гідроксибензил)тiazолієвого іону або утворюються при взаємодії тіаміну чи його тiazолієвих аналогів з бензальдегідом і молекулярним киснем. Механізм реакції включає одноелектронне окиснення іонізованого C( $\alpha$ )-енаміну молекулярним киснем та наступну стадію протонування радикального інтермедіату з утворенням, в залежності від природи тiazолієвого іону, похідних

енолу чи 2-бензоїлтіазоліну. Спектральні та кінетичні дані реакцій карбонільних сполук за аеробних та анаеробних умов свідчать про те, що інгібування тіазолієвого каталізу молекулярним киснем обумовлено витрачанням каталізатора внаслідок побічних вільнорадикальних перетворень проміжного C(α)-енаміну.

4. Знайдено, що сольватація іону тіазолію метанолом в неполярному апротонному розчиннику, яка моделює донорно-акцепторні взаємодії тіаміну і ТДФ, супроводжується змінами форми сигналу ПМР та хімічного зсуву протону в положенні 2. Окиснювальний розклад 2-(1-гідроксиетил)- та 2-(1-гідроксибензил)тіаміну за наявності фериціаніду, що включає стадію швидкого розриву C(2)-C(α)-зв'язку з вивільненням альдегіду, ініціюється радикальним окисненням 4'-аміногрупи піримідинового циклу і може розглядатися як модель ТДФ-залежних перетворень в полярному оточенні.

5. Здатність хінонів та молекулярного кисню змінювати перебіг тіазолієвого каталізу реалізується як в модельній хімічній системі, так і в процесі ферментативного каталізу дріжджовою піруватдекарбоксілазою. Встановлено, що при спільній дії субстрату та молекулярного кисню чи хінону відбувається незворотна інактивація ферменту. Показано, що механізм інактивації піруватдекарбоксілази за наявності субстрату та хінону включає взаємодію окисника з проміжним у ферментативній реакції "активним ацетальдегідом".

6. Кількісна оцінка залежності константи швидкості паракаталітичної інактивації дріжджової піруватдекарбоксілази від редокс-потенціалу хінону узгоджується з механізмом одноелектронного відновлення хінону до семихінону без стеричних перешкод з боку ферменту. Наступною стадією є швидка модифікація семихіноном найближчого амінокислотного оточення. За наявності фериціаніду, що окис-

нює семихінон, моделюється часткова зміна реакційної специфічності ферменту з розподілом потоків окиснювального та неокиснювального декарбоксілювання.

7. В результаті дослідження інгібування дріжджової піруватдекарбоксілази *n*-алкілфосфатами, конкурентного щодо субстрату, встановлено, що активна поверхня ферменту має щонайменше дві гідрофобні ділянки, одна з яких знаходиться поза центром зв'язування пірувату. Продемонстровано, що формування гідрофобного оточення в процесі паракаталітичних взаємодій зменшує величину константи швидкості інактивації дріжджової піруватдекарбоксілази хіноновими акцепторами електронів.

8. Узагальнення модельних механістичних закономірностей свідчить про те, що паракаталітична інактивація дріжджової піруватдекарбоксілази спричинена порушенням механізмів ферментативного транспорту протону від C( $\alpha$ )-гідроксилу замісника в положенні 2 після переходу одного електрону від "активного ацетальдегіду" на молекулу окисника. На підставі отриманих даних запропоновано гіпотезу про паракаталітичні перетворення піруватдекарбоксілази у складі піруватдегідрогеназного комплексу при дії молекулярного кисню або хінонових ксенобіотиків.

9. На основі результатів дослідження гідрофобних взаємодій дріжджової піруватдекарбоксілази, як модельних стосовно ТДФ-залежних ферментів і тіамінзв'язуючих білків, було синтезовано *N*-алкілоксикарбонілметильні похідні тіазолію, зокрема, 3-децоксикарбонілметил-4-метил-5- $\beta$ -гідроксиетилтіазолій хлорид і 3-децоксикарбонілметил-4-метилтіазолій хлорид, що пригнічують нервово-мускульну передачу і виявляють транквілізуючі властивості.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Вовк А.И. Химические модели и механизмы действия тиаминпирофосфата // В кн.: Фотосинтез. Химические модели и механизмы / Киев, "Наукова думка".- 1989.- С. 65-98.
2. Вовк А.И. Пируватдекарбоксилаза: механистические модели паракаталитических взаимодействий // Укр. биохим. журн. - 1996. - Т. 68, N 3. - С. 13-26 (оглядова робота).
3. Ясников А.А., Вовк А.И., Мурадов А.З. и др. Бензоиновая конденсация, катализируемая тиамином и тиаминпирофосфатом. Влияние молекулярного кислорода // Биоорг. химия.- 1983.- Т. 9, N 7.- С. 971-974.
4. Вовк А.И., Пархоменко Ю.М., Бабичева А.Ф., Черных И.Ю. Простой метод определения ацетоина и его приложение для анализа активности пируватдегидрогеназы // Укр. биохим. журн.- 1982.- Т. 54, N 6.- С. 674-678.
5. Пархоменко Ю.М., Вовк А.И., Протасова З.С. и др. Влияние тиамина на активность пируватдегидрогеназного комплекса печени крыс при интенсификации липогенеза // Укр. биохим. журн. - 1983.- Т. 54, N 4.- С. 408-414.
6. Вовк А.И., Ясников А.А. Превращения бензила, катализируемые солями тиазолия // Укр. хим. журн.- 1984.- Т. 50, N 10.- С. 1094-1096.
7. Вовк А.И., Муравьева И.В., Ясников А.А. Механизм расщепления ацетилбензоила в метаноле, катализируемого солями тиазолия // Укр. хим. журн.- 1985.- Т. 51, N 5.- С. 521-525.
8. Муравьева И.В., Вовк А.И., Волкова Н.В. и др. Фотофосфорилирующая активность хлоропластов в присутствии тиазолиевых солей // Докл. АН УССР, Сер. Б.- 1985.- N 10.- С. 72-74.

9. Вовк А.И., Муравьева И.В., Ясников А.А. Каталитическое действие тиазолиевых солей в реакции окисления альдегидов хинонами. Новая модель пируватдегидрогеназного комплекса // Журн. общ. химии.- 1985.- Т. 55, вып. 7.- С. 1574-1579.
10. Yasnikov A.A., Vovk A.I., Melnichenko I.V. et al. Chemical models of TPP-dependent enzymes and methylglyoxalsynthetase // Fundamental research in homogeneous catalysis. - Gordon & Breach.- 1986.- P. 755-761.
11. Вовк А.И., Муравьева И.В., Ясников А.А. Восстановление хинонов в реакции окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты, катализируемой солями тиазолия // Журн. общ. химии.- 1987.- Т. 57, вып. 2.- С. 456-460.
12. Ясников А.А., Сосонкин И.М., Вовк А.И. и др. Взаимодействие анион-радикала кислорода с тиамином на вращающемся дисковом золотом амальгамированном электроде // Докл. АН УССР, Сер. Б.- 1987.- N 5.- С. 50-52.
13. Вовк А.И., Муравьева И.В., Ясников А.А. Влияние кислорода на превращение пировиноградной кислоты в ацетоин в присутствии солей тиазолия и тиамина // Укр. хим. журн. -1987. - Т. 53, N 9.- С. 957-959.
14. Постоенко В.А., Пархоменко Ю.М., Вовк А.И. и др. Выделение и некоторые свойства тиаминсвязывающего белка синапсом головного мозга крыс // Биохимия.- 1987.- Т. 52, вып. 11.- С. 1792-1797.
15. А.В.Романенко, А.И.Вовк. Действие производных 3-бензилтиазолий хлорида на нервно-мышечную передачу // Докл. АН УССР, Сер. Б.- 1988.- N 11.- С. 75-77.
16. Вовк А.И., Муравьева И.В. Механизм окисления "активного аль-

- дегида" кислородом в модельных реакциях тиаминпирофосфата // Журн. общ. химии.- 1989.- Т. 59, вып. 5.- С. 1183-1188.
17. Вовк А.И., Романенко А.В., Муравьева И.В., Зайцев Л.М. 3-Деоксикарбонилметил-4-метил-5-β-гидроксиэтилтиазолий хлорид или 3-деоксикарбонилметил-4-метилтиазолий хлорид, угнетающие нервно-мышечную передачу и обладающие транквилизирующей активностью // А. с. СССР N 1547267.
18. Вовк А.И., Хрипко С.С. Инактивация дрожжевой апопируватдекарбоксилазы липофильными N-алкилзамещенными солями тиазолия // Укр. биохим. журн.- 1990.- Т. 62, N 5.- С. 48-54.
19. Вовк А.И., Муравьева И.В. Свободные радикалы в реакциях, катализируемых тиамином // Журн. общ. химии.- 1990.- Т. 60, вып. 8.- С. 1867-1871.
20. Вовк А.И., Муравьева И.В. Модельные реакции пируватдекарбоксилазы. Механизмы образования альдегида из 2-(α-гидроксбензил)-тиазолиевого иона // Журн. общ. химии.- 1991.- Т. 61, вып. 11.- С. 2595-2601.
21. Вовк А.И., Муравьева И.В. Сольватация тиазолиевого иона // Журн. общ. химии.- 1991.- Т. 61, вып. 12.- С. 2730-2736.
22. Вовк А.И., Лазукина Л.А., Муравьева И.В., Кухарь В.П. Ингибирование дрожжевой пируватдекарбоксилазы алкилфосфатами // Укр. биохим. журн.- 1992.- Т. 64, N 3.- С. 52-56.
23. Вовк А.И., Хрипко С.С., Муравьева И.В. Инактивация пируватдекарбоксилазы при взаимодействии с субстратом и молекулярным кислородом // Укр. биохим. журн.- 1992.- Т. 64, N 5.- С. 42-47.
24. Вовк А.И., Романенко А.В. Тиазолиевые аналоги витамина B<sub>1</sub>, угнетающие нервно-мышечную передачу // Докл. АН УССР, Сер. Б.- 1993.- N 5.- С. 119-121.

25. Вовк А.И., Муравьева И.В. Паракаталитическая инактивация пируватдекарбоксилазы в присутствии хинонов // Укр. биохим. журн.- 1993.- Т. 65, N 2.- С. 42-47.
26. Вовк А.И., Муравьева И.В. Механизм взаимодействия хинонов с 2 $\alpha$ -карбанионом в активном центре пируватдекарбоксилазы // Укр. биохим. журн.- 1993.- Т. 65, N 2.- С. 47-52.
27. Вовк А.И., Муравьева И.В. Окислительное разложение 2-( $\alpha$ -гидроксibenзил)тиамина при взаимодействии с основанием и замещенными хинонами // Журн. общ. химии. - 1994. - Т. 64, вып. 6.- С. 1037- 1040.
28. Вовк А.И., Муравьева И.В. Паракаталитическое взаимодействие пируватдекарбоксилазы с хинонами в присутствии органического растворителя. Формирование активного центра, затрудняющего перенос протона // Укр. биохим. журн.- 1993.- Т. 65, N 4.- С. 11- 16.
29. Вовк А.И., Муравьева И.В. Модельные реакции тиаминдифосфат-зависимых ферментов. Взаимодействие 2-(1-гидроксиэтил)тиамина с феррицианидом // Журн. общ. химии. - 1994.- Т. 64, вып. 9.- С. 1550-1553.
30. Вовк А.И., Муравьева И.В. Окисление 2-(1-гидроксibenзил)тиамина молекулярным кислородом, катализируемое основанием // Журн. общ. химии.- 1995.- Т. 65, вып. 1.- С. 137-140.
31. Романенко А.В., Вовк А.И., Шатурский О.Я. Действие тиазольных аналогов витамина B<sub>1</sub> на нервно-мышечную передачу и вызванную  $\alpha$ -латротоксином секрецию медиатора скелетной мышцы // Нейрофизиология.- 1995.- Т. 27, N 5/6.- С. 368-374.
32. Романенко А.В., Гнатенко В.М., Владимирова И.А., Вовк А.И. Пре- и постсинаптическая модуляция нервно-мышечной передачи в

- гладких мышцах тиазолиевыми аналогами витамина В<sub>1</sub> // Нейрофизиология. 1995.- Т. 27, N 5/6.- С. 375-386.
33. Вовк А.И., Пархоменко Ю.М., Муравьева И.В., Протасова З.С. Взаимодействие пируватдекарбоксилазы с окислительной системой хинон-феррицианид // Укр. биохим. журн.- 1996.- Т. 68, N 2.- С. 58-63.
34. Вовк А.И., Пархоменко Ю.М., Муравьева И.В., Протасова З.С. Инактивация дрожжевой пируватдекарбоксилазы в присутствии субстрата и хиноновых акцепторов электронов // Укр. биохим. журн. - 1996.- Т. 68, N 2.- С. 105-109.

Аннотация. Вовк А.И. Химические модели и механизмы тиаминдифосфат-зависимых окислительно-восстановительных превращений. Рукопись. Диссертация на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия, химия природных и физиологически активных веществ. Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины. Киев, 1996.

Диссертация содержит результаты исследования неферментативных модельных и ферментативных тиаминдифосфат-зависимых систем: органический катализатор (кофермент) - субстрат - окислитель. Установлены механизмы окислительно-восстановительных реакций, катализируемых солями тиазолия. Выяснены механизмы окислительно-восстановительных стадий, вызывающих ингибирование тиазолиевого катализа. Установлены механизмы паракаталитической инактивации дрожжевой пируватдекарбоксилазы при действии окислителей. Предложены механистические модели нарушений функционирования тиаминдифосфат-зависимых ферментов. Обоснован поиск соединений, обладающих биологической активностью.

Summary. Vovk A.I. Chemical models and mechanisms of thiamin diphosphate dependent reductive-oxidative transformation. Manuscript. Dissertation submitted in fulfilment of requirements for a scientific degree of Doctor of Sciences (Chemistry) on the speciality of 02.00.10 - Bioorganic Chemistry, Chemistry of Natural and Physiologically Active Substances. Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, NAS of Ukraine. Kyiv, 1996.

The dissertation contains results of an investigation of non-enzymic and enzymic thiamin diphosphate dependent systems including organic catalyst (coenzyme), substrate and oxidant. Mechanisms of reductive-oxidative reactions catalyzed by thiazolium salts have been established. Mechanisms of reductive-oxidative stages leading to the inhibition of thiazolium catalysis were elucidated. Mechanisms of paracatalytic inactivation of yeast pyruvate decarboxylase under the influence of oxidant were determined. Mechanistic models of breaches in the functioning of thiamin diphosphate dependent enzymes were proposed. There was a sound basis for the search for biologically active compounds.

Ключові слова: тіамін (вітамін B<sub>1</sub>), солі тiazолію, тіаміндифосфат, дріжджова піруватдекарбоксілаза, тіаміндифосфат-залежні ферменти, молекулярний кисень, хінони, хімічні моделі, механізми.

*ABOK*

---

Подписано к печати 10.10.96г. Формат 60x84/16.  
Объем: 2.0 усл.-печ.л., 2.0 уч.-изд.л.  
Тираж 100. Заказ 55.

---

Типография во Флоровском монастыре  
тел. 416-54-62

U30250

AB 35.812