

УДК 577.1

## МЕХАНИЗМЫ НЕКОФЕРМЕНТНОГО ДЕЙСТВИЯ ТИАМИНА: БЕЛКОВЫЕ МИШЕНИ И МЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

### Обзор

© 2019 В.А. Алешин<sup>1,2</sup>, Г.В. Мкртчян<sup>1</sup>, В.И. Буник<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Россия;  
электронная почта: bunik@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 27.12.2018

После доработки 21.03.2019

Принята к публикации 07.04.2019

Тиамин (витамин В1) является предшественником известного кофермента тиаминдифосфата (ТДФ). Высочайшая интенсивность ТДФ-зависимой выработки энергии при окислении глюкозы в мозге определяет критическое значение тиамин для деятельности нейронов. Однако существуют и некоферментные механизмы действия тиамин. Давно известное усиление ацетилхолинового сигнала при совместном выбросе тиамин и ацетилхолин в синаптическую щель на настоящий момент подтверждено такими молекулярными процессами, как фосфорилирование взаимодействующего с ацетилхолиновым рецептором белка рапсина за счет тиаминтрифосфата (ТТФ) и взаимодействие тиамин с рецептором TAS2R1, усиливающее синаптические потоки ионов. Некоферментное взаимодействие с тиаминными соединениями показано и для транскрипционного фактора р53, поли(ADP-рибозо)-полимеразы, прионного белка PRNP и ряда ключевых ферментов центрального метаболизма, не использующих ТДФ в качестве кофермента. Таким образом, анализ полученных результатов указывает на значительно большее, чем обычно полагают, разнообразие механизмов нейротропного действия тиамин. С этими механизмами тесно связан метаболизм тиаминных соединений в клетках животных, современные представления о котором также суммированы в обзоре. Актуальность тематики продемонстрирована на примере недавно установленной конкуренции тиамин и широко применяемого антидиабетического препарата метформин за общие внутриклеточные транспортеры. Конкурентный транспорт вызывает дефицит тиамин, лежащий в основе ряда побочных эффектов метформин. В обзоре рассмотрены и такие медицинские аспекты фундаментальных исследований тиамин, как роль тиаминаз в реутилизации тиамин и биосинтезе его антагонистов, механизмы действия природных и синтетических антагонистов тиамин, биотрансформация используемых в медицине фармакологических форм тиамин. Широкая практика лекарственного применения тиамин и его синтетических форм определяет актуальность представленных в обзоре исследований для медицины и фармакологии, включая лечение нейродегенеративных заболеваний.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** витамин В1, метформин, р53, серпины, тиамин, тиаминаз, транспорт тиамин.

DOI: 10.1134/S0320972519080013

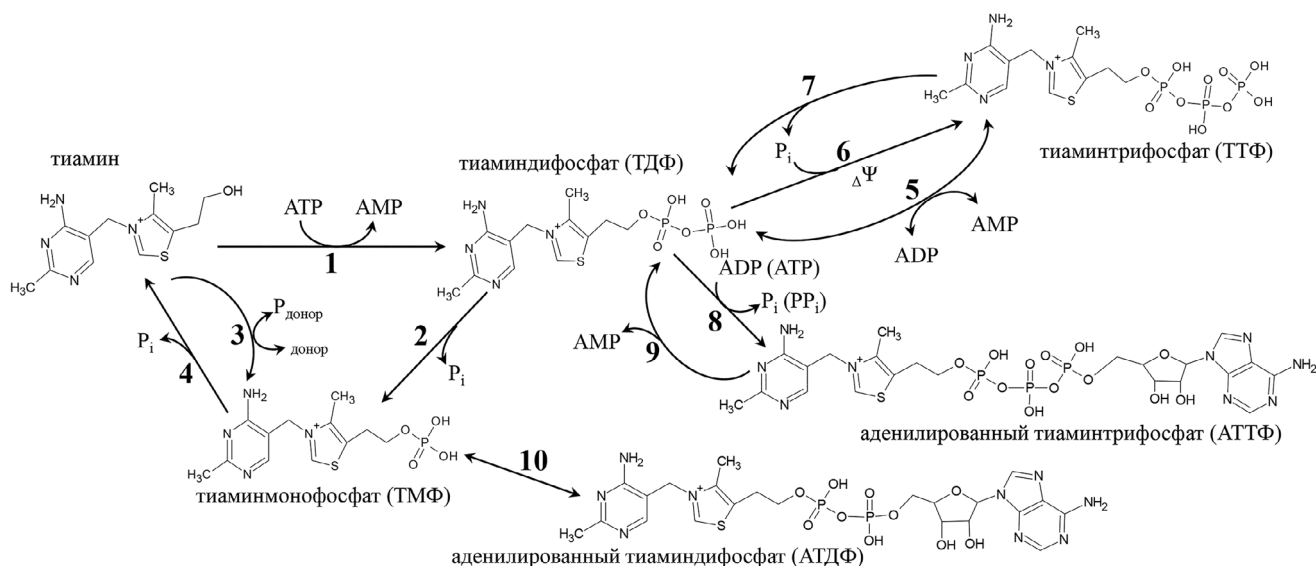
Тиамин (витамин В1) является незаменимым водорастворимым витамином, широко используемым при лечении неврологических расстройств. В организм млекопитающих тиамин попадает экзогенным путем, а у растений,

бактерий, архей, протист и грибов – синтезируется *de novo*. Молекула тиамин образуется за счет объединения двух гетероциклов – шестичленного аминопиримидинового и пятичленного тиазолового. В результате их соединения метиленовым мостиком с участием атома азота тиазолового кольца последнее переходит в форму тиазолия, несущего положительный заряд (рис. 1). Гидроксиэтильная группа тиазолиевого кольца тиамин подвергается фосфорилированию *in vivo* при синтезе различных природных производных тиамин (рис. 1).

Молекула тиамин имеет много потенциальных центров окисления, которое может затрагивать как аминопиримидиновую, так и тиа-

Принятые сокращения: АДДФ – аденилированный тиаминдифосфат; АТТФ – аденилированный тиаминтрифосфат; ОДГК – 2-оксoglутаратдегидрогеназный комплекс; ПАРП – поли(ADP-рибозо)-полимераз; ПДГК – пируватдегидрогеназный комплекс; ТДФ – тиаминдифосфат; ТДФаза – тиаминдифосфатаза; ТМФ – тиаминмонофосфат; ТМФаза – тиаминмонофосфатаза; ТТФ – тиаминтрифосфат; ТТФаза – тиаминтрифосфатаза; ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

\* Адресат для корреспонденции.

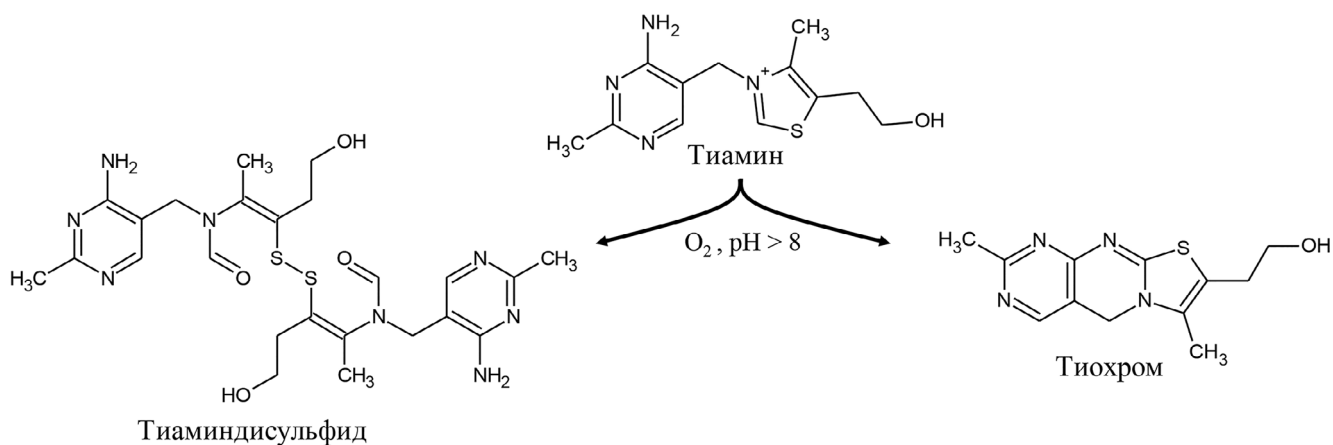


**Рис. 1.** Тиамин, его природные производные и их взаимные превращения в клетках животных. Номерами обозначены реакции, катализируемые следующими ферментами: 1 – тиаминдифосфокиназа, 2 – ТДФаза, 3 – фермент фосфорилирования тиамин, 4 – ТМФаза, 5 – аденилаткиназа, 6 – ТТФ-синтаза, 7 – ТТФаза, 8 – ТДФ-аденилилтрансфераза, 9 – АТТФ-гидролаза, 10 – ТМФ-аденилилтрансфераза

золиевую части тиамин. В зависимости от условий можно наблюдать окисление тиамин до тиохрома, тиаминдисульфида (рис. 2) и других окисленных форм, таких как рассмотренные ниже антагонисты тиамин 4'-окситиамин или 2-окситиамин. Окисление феррицианидом в щелочных условиях ( $\text{pH} > 12$ ) способствует количественному превращению тиамин во флуоресцирующий тиохром (рис. 2) и служит одним из методов определения тиамин и его производных. Окисление при реакции тиамин с активными формами кислорода и азота [1] может обеспечивать антиоксидантные свойства высоких доз тиамин. С другой стороны, стимуля-

ция реакции тиамин и производных с активными формами кислорода и азота при сильном окислительном стрессе (например, в условиях радиационного поражения) может приводить к уменьшению общего пула тиамин в организме человека и животных [2].

Нейротропное действие тиамин в организме человека и млекопитающих известно с 80-х гг. XIX века, когда началось систематическое исследование болезни «бери-бери». В результате в 1926 г. тиамин стал первым из структурно идентифицированных витаминов, хотя механизм его каталитического действия в качестве кофермента (ТДФ) был расшифрован гораздо позднее.



**Рис. 2.** Окисление тиамин до тиаминдисульфида и тиохрома

У млекопитающих наиболее важными ТДФ-зависимыми ферментами являются транскетолаза, пируватдегидрогеназный комплекс (ПДГК) и 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс (ОГДГК). Это ферменты центральных метаболических путей клетки. Транскетолаза — цитоплазматический фермент пентозофосфатного пути. В организме человека известны три паралогичных гена транскетолазы: *TKT*, *TKTL1* и *TKTL2*. Экспрессия *TKTL1* повышена при различных типах рака, однако данные о связывании ТДФ и наличии транскетолазной активности у белкового продукта *TKTL1* противоречивы [3–5]. Функция ПДГК и ОГДГК, ключевых полиферментных комплексов окислительного метаболизма митохондрий, критична для выживаемости нейронов и подробно рассмотрена в монографии [6] и ряде обзоров [7, 8]. Обнаруженные у млекопитающих изоформы ТДФ-зависимой 2-оксоглутаратдегидрогеназы (ген *OGDH*) кодируются генами *OGDHL* и *DHTKD1* и являются тканеспецифическими компонентами аналогичных ОГДГК с измененной регуляцией и/или субстратной специфичностью [6]. ТДФ также используется в качестве кофермента митохондриального комплекса дегидрогеназ разветвленных 2-оксокислот (ключевой фермент катаболизма разветвленных аминокислот [6]) и ферментов  $\alpha$ -окисления жирных кислот — пероксисомальной 2-гидроксицитаноил-КоА-лиазы (ген *HACL1*) и ее недавно обнаруженного паралога (ген *ILVBL* или *HACL2*).

При глубоком дефиците тиамин у животных наблюдается опистотонус — судорожная поза с резким выгибанием спины, запрокидыванием головы, судорожным напряжением конечностей. Такой дефицит тиамин может вызывать паралич и приводить к гибели в течение нескольких дней. Одной из патологий, вызываемых дефицитом тиамин, является синдром Вернике—Корсакова [9]. Ранее данный синдром в основном наблюдали у алкоголиков, однако в последнее время его все чаще обнаруживают при ряде состояний, вызывающих скрытый дефицит тиамин. Такие состояния могут возникать вследствие применения диуретиков и других лекарственных препаратов, в частности метформина, радиотерапии и хирургических вмешательств.

Существенно сложнее, чем выраженный дефицит тиамин, диагностируется гиповитаминоз тиамин. Симптомами гиповитаминоза тиамин у человека являются апатия, ухудшение памяти, отсутствие активности и ипохондрия. Большое количество данных свидетельствует о связи гиповитаминоза тиамин и/или нарушений его метаболизма с нейродегенеративными

заболеваниями, в т.ч. болезнями Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона [7, 10, 11]. Показаны значительное снижение активностей ТДФ-зависимых ферментов центрального метаболизма у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями и корреляция между снижением функции ОГДГК и потерей когнитивных способностей [12]. При этом высокие дозы тиамин в ряде случаев приводят к улучшению когнитивных и локомоторных функций у пациентов, страдающих нейродегенеративными заболеваниями [13, 14]. Длительное введение высоких доз тиамин (100 мг внутримышечно 2 раза в неделю) не способствовало появлению побочных эффектов [14], хотя описаны случаи смертельного исхода при внутривенном введении тиамин [15]. В экспериментах на животных введение высоких доз тиамин непосредственно в мозг или спинномозговую жидкость могло вызывать конвульсии, однако для людей такие побочные эффекты тиамин не описаны [15].

Традиционно положительное действие тиамин на нервную систему объясняют улучшением энергетического метаболизма мозга за счет коферментной функции тиаминдифосфата (ТДФ). Однако некоторые результаты, в т.ч. исследования действия тиамин или его аналогов в моделях нейродегенеративных заболеваний на животных, не укладываются в представление о том, что ключевая роль тиамин в нервной ткани определяется лишь ролью ТДФ в качестве кофермента. Так, положительный нейротропный эффект тиамин и/или его лекарственных форм часто не сопровождается увеличением содержания ТДФ в мозге [11, 16, 17], указывая на существование иных механизмов действия тиамин. Целью настоящего обзора является критическое обобщение существующих в литературе данных о роли некоферментного типа связывания тиаминовых соединений и белковых мишенях такого связывания у млекопитающих.

### ПРИРОДНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ТИАМИНА И ИХ ВНУТРИКЛЕТочНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ

За исключением коферментной функции ТДФ и некоторых аспектов биологического значения тиаминмонофосфата (ТМФ), роль природных производных тиамин в клетках животных на настоящий момент практически не охарактеризована. Определение локализации природных производных тиамин в клетке и молекулярная идентификация взаимодействующих с ними ферментов способствуют решению дан-

ной проблемы. Например, преимущественную локализацию того или иного производного следует учитывать при поиске его белковых мишеней, а также для оценки клеточных концентраций с учетом компартиментализации.

Внутриклеточный тиамин присутствует не только в свободной форме, но и в виде фосфорилированных производных [18, 19]. Такими производными тиамин являются ТМФ, ТДФ, ТТФ, а также недавно идентифицированные аденилированные производные ди- и трифосфата тиамин (АТДФ и АТТФ соответственно) [20] (рис. 1). Относительное содержание различных производных тиамин, составляющих тиаминный пул клетки, видо- и тканеспецифично. В большинстве случаев пул в основном (~90%) представлен ТДФ (рис. 1) [19]. В среднем количество ТДФ в разных тканях варьирует в диапазоне 20–150 пмоль на 1 мг белка. Если учесть, что в среднем белок составляет ~20% массы эукариотической клетки, такое содержание соответствует внутриклеточной концентрации 4–30 мкМ. Свободный тиамин составляет не более 5 пмоль на 1 мг белка (1 мкМ) [19]. Следует, однако, понимать условность таких оценок. В частности, внутриклеточное содержание не является гомогенным. Поэтому преимущественная локализация тиамин и его природных производных в различных клеточных компартаментах может обуславливать значительные расхождения между усредненной и локальной концентрациями. Помимо пространственного фактора, существуют и временные изменения концентраций, связанные с регуляцией синтеза и транспорта биологически активных соединений в зависимости от условий окружающей среды.

У бактерий, грибов и растений регуляция уровня ТДФ контролируется с участием ТДФ-рибопереклочателя. РНК, считываемые с генов, кодирующих белки метаболизма и транспорта тиамин, содержат консервативную нуклеотидную последовательность в 5'-нетранслируемой области, способную специфическим образом связывать ТДФ. Такое связывание ТДФ с РНК регулирует экспрессию соответствующих генов биосинтеза тиамин и ТДФ за счет воздействия на транскрипцию и трансляцию, а у представителей эукариот – и на альтернативный сплайсинг [21]. У животных, не способных к самостоятельному синтезу тиамин, не было найдено подобного ТДФ-рибопереклочателя, однако существуют механизмы контроля метаболизма тиамин с участием некодирующих РНК. Так, микроРНК miR-155 регулирует экспрессию клеточного транспортера тиамин ТНТН-1, кодируемого геном *SLC19A2*, тиамин-

дифосфокиназы (синтез ТДФ) и митохондриального транспортера ТДФ, кодируемого геном *SLC25A19* [22]. Кроме того, у животных ТДФ регулирует активность р53 путем связывания с этим транскрипционным фактором, которое конкурентно по отношению к связыванию р53 с ДНК [23]. Поскольку р53 способен активировать экспрессию транспортера тиамин ТНТН-1 (*SLC19A2*) [24], он может быть «сенсором» уровня ТДФ у млекопитающих, аналогичным ТДФ-рибопереклочателю организмов, способных к биосинтезу тиамин. Таким образом, представители различных царств живых организмов реализуют ряд молекулярных механизмов контроля внутриклеточного уровня ТДФ, основанных на некоферментном типе связывания ТДФ с компонентами клетки. В случае клеток животных таким сенсором ТДФ может быть белок р53.

Несмотря на то что в большинстве клеток основной представитель пула тиаминных соединений – ТДФ, в отдельных тканях животных преимущественным компонентом пула является другое производное тиамин – тиаминтрифосфат (ТТФ) (рис. 1). Его концентрация превышает концентрацию ТДФ, например, в скелетных мышцах свиньи, курицы, в электрическом органе угря *Electrophorus electricus* [19]. В тканях человека ТТФ содержится в количестве не более 3 пмоль на 1 мг белка (0,6 мкМ), а в мозге млекопитающих ТТФ составляет до 1% от общего пула тиамин [19]. По некоторым данным, количество ТТФ падает в мозге у пациентов с болезнью Лея и миелозцефалопатией [25, 26].

ТТФ обнаружен у живых организмов всех царств и рассматривается в качестве сигнальной молекулы, индуцируемой при метаболическом стрессе [27]. У животных известно ТТФ-зависимое фосфорилирование белка рапсина, участвующего в организации ацетилхолиновых рецепторов в синапсах [28]. Хотя идентифицировать киназу рапсина, участвующую в таком ТТФ-зависимом фосфорилировании, не удалось, данный процесс может быть связан с известным с начала XX века усилением ацетилхолинергической нейротрансмиссии при совместном выбросе ацетилхолин и тиамин в синаптическую щель [29, 30]. В независимых исследованиях было обнаружено, что процесс высвобождения тиамин при электрической стимуляции нервов предполагает дефосфорилирование ТДФ и ТТФ [31]. Тем не менее данные о молекулярных механизмах некоферментного действия тиамин в ацетилхолинергической нейротрансмиссии до сих пор остаются фрагментарными.

Аденилированное производное тиаминтрифосфата, АТТФ (рис. 1), также идентифициро-



вано у представителей всех царств, в т.ч. в тканях и культурах клеток животных. Количественные исследования показали, что в мозге содержание АТТФ не превышает 0,3 пмоль на 1 мг белка [19, 20]. В клетках линии глиобластомы человека LN-18 содержание АТТФ достигало 20 пмоль на 1 мг белка (4 мкМ) [19]. У млекопитающих показаны специфичное ингибирование поли(АДР-рибозо)-полимеразы 1 (ПАРП) при концентрации 1–10 мкМ АТТФ [32] и активация глутаматдегидрогеназы в том же диапазоне концентраций АТТФ [33].

Содержание ТМФ (рис. 1) в мозге колеблется в диапазоне 2–15 пмоль на 1 мг белка (0,4–3,0 мкМ) [19]. Помимо тиамина, ТМФ является единственным природным производным тиамина, существенно представленным в плазме крови [19] и способным проходить через гематоэнцефалический барьер [34].

Фракционирование тканей для определения внутриклеточной локализации тиамина и его производных показало, что в мозге, почках, печени и скелетных мышцах тиамин, ТМФ и ТДФ присутствуют как в цитозоле, так и во фракции клеточных органелл. ТТФ распределяется приблизительно в равной степени между цитозолем и органеллами в печени, а в сердце и мозге локализован преимущественно во фракции клеточных органелл [35]. Разделение гомогенатов мозга крысы методом дифференциального центрифугирования показало, что в основном тиамин и ТМФ определяются в цитозольной фракции, а ТДФ – в митохондриях [36]. Внутриклеточная локализация ТТФ, как и его представленность в общем пуле тиаминовых соединений, сильно зависит от организма и типа ткани. Так, в электрическом органе *Electrophorus electricus* практически весь (96%) ТТФ содержится в свободном (не связанном с белком) виде в цитозольной фракции. В мозге крысы основная часть ТТФ определяется в синапсоматах и митохондриях, тогда как в цитозоле его количество незначительно [36, 37].

Таким образом, клеточная локализация и относительное содержание тиаминовых соединений могут значительно варьировать. Усредненные концентрации некоферментных производных тиамина в тканях и клетках млекопитающих могут достигать  $10^{-5}$  М, а концентрация ТДФ –  $10^{-4}$  М. Такие концентрации ТДФ на порядок выше необходимых для насыщения ферментов, использующих ТДФ в качестве кофермента [7]. Вполне возможно, что такой избыток связан с реализацией некоферментных функций тиаминовых соединений при более высоких, чем требуемые для коферментного действия, концентрациях.

### БЕЛКИ, УЧАСТВУЮЩИЕ В МЕТАБОЛИЗМЕ ТИАМИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Исследование катализируемых ферментами взаимных превращений тиамина и его производных необходимо для понимания механизмов поддержания требуемых концентраций и внутриклеточной локализации тиаминовых соединений в биосистемах. Регуляторное действие различных производных тиамина может зависеть, в частности, от тканеспецифической экспрессии белков метаболизма тиамина.

Основные типы ферментативных реакций, вовлеченных во взаимные превращения тиаминовых соединений у млекопитающих, представлены на рис. 1. В цитоплазме клетки тиамин подвергается АТР-зависимому фосфорилированию до ТДФ с помощью фермента тиаминдифосфокиназы (ЕС 2.7.6.2, реакция 1, рис. 1). Цитоплазматический синтез ТДФ способствует транспорту тиамина в клетку за счет увеличения градиента концентрации тиамина. Тиаминдифосфокиназа (ген *TPK1*) представляет собой гомодимер с молекулярной массой 50–64 кДа. Описанные мутации данного фермента у человека приводят к синдрому Лея и различным энцефалопатиям вследствие лактатного или 2-оксоглутаратного ацидоза, возникающего при нарушении ТДФ-зависимого катаболизма пирувата и 2-оксоглутарата [38, 39].

Кофермент ТДФ может гидролизироваться фосфатазами ТДФ (ТДФазами) с образованием ТМФ (реакция 2, рис. 1). Оказалось, что ТДФазы печени и почек проявляют одинаково выраженный максимум активности при pH 9, тогда как для ТДФаз мозга характерно наличие двух pH-оптимумов – при pH 6 и pH 9. В связи с этим рассматривают два типа ТДФаз – мозговую (В, от англ. «brain») и печеночную (L, от англ. «liver») [40]. Обе эти гидролазы не активны в отношении ТМФ. Подобная черта характерна для белков семейства апираз, гидролизующих нуклеозидди- и трифосфаты, но не способных к гидролизу нуклеозидмонофосфатов. Недавно было показано связывание и гидролиз ТДФ бактериальными апиразами [41]. В геноме человека имеется не менее восьми паралогичных генов апираз (*ENTPD1–8*), играющих важную роль в регуляции пуринергического сигнала. Анализ данной литературы позволяет предположить, что ранее охарактеризованные, но не идентифицированные на молекулярном уровне ТДФазы млекопитающих [40] могут принадлежать к семейству апираз.

Имеется мало данных о ферментах метаболизма ТМФ у животных (рис. 1). Показано, что

ТМФ может образовываться не только путем гидролиза ТДФ (реакция 2, рис. 1), но и из тиаминина путем энергозависимого переноса фосфата с различных доноров (реакция 3, рис. 1), таких как  $\beta$ -глицерофосфатат или креатинфосфат [42]. Эти реакции катализирует щелочная фосфатаза кишечника (ген *ALPI*) [42], обеспечивающая активный транспорт тиаминина из полости кишки посредством энергозависимого синтеза ТМФ. Внеклеточная локализация трансмембранной кислой фосфатазы простаты согласуется с циркуляцией ТМФ в плазме крови. ТМФазная активность трансмембранной кислой фосфатазы простаты, кодируемой геном *ACPP* (реакция 4, рис. 1), необходима для ноцицептивного действия монофосфорилированных производных тиаминина в задних корешках спинного мозга [43, 44]. Считается, что гидролиз ТМФ до тиаминина (реакция 4, рис. 1) необходим для образования ТДФ в реакции 1 (рис. 1).

Синтез ТТФ в нервных клетках был впервые охарактеризован в середине XX века. С использованием [ $^{14}\text{C}$ ]тиаминина в экспериментах на животных и клеточных культурах показано, что накопление ТТФ может происходить даже быстрее накопления ТДФ [36]. Наиболее очевидным механизмом синтеза ТТФ является перенос фосфатной группы с АТР на ТДФ. Фермент, катализирующий реакцию фосфорилирования ТДФ с помощью АТР, получил название ТДФ-фосфорилтрансфераза или ТТФ-синтаза. Данную реакцию катализировал ферментный препарат ацетонового порошка экстрактов спинного мозга свиньи [45], но сам фермент не был охарактеризован. Позже было показано, что очищенная из ацетонового порошка митохондриальной фракции мозга быка ТДФ-фосфорилтрансфераза в присутствии ионов двухвалентных металлов катализирует реакцию, продукт которой (ТТФ) остается связанным с белком [46]. На молекулярном уровне продуцирующий ТТФ фермент не идентифицирован даже у бактерий, у которых ТТФ может накапливаться при стрессе в качестве сигнальной молекулы [27]. Отсутствие молекулярной идентификации значительно затрудняет исследование физиологической роли ТТФ с использованием генно-инженерных подходов.

Аденилаткиназа может катализировать перенос фосфата с АДФ на ТДФ с образованием АМР и ТТФ *in vitro* [18] (реакция 5, рис. 1), однако биологическая роль этой реакции не очевидна. С одной стороны, исследование мутации Arg128Trp в сайте связывания АТР гена *AKI* у пациента с расстройством функции аденилаткиназы показало увеличение продукции ТТФ такой мутантной формой по сравнению с натив-

ной аденилаткиназой 1 [47]. С другой стороны, нокаут гена *AKI* не изменяет уровень ТТФ *in vivo* [48], что согласуется с далеким от физиологического ( $\sim\text{pH } 10$ ) оптимумом pH синтеза ТТФ этой аденилаткиназой [49] и высокой константой Михаэлиса ( $K_m = 0,83 \text{ мМ}$ ) по сравнению с концентрацией свободного ТДФ в цитозоле клеток ( $10^{-5} \text{ М}$ ) [36]. Однако с учетом данных современной геномики о существовании у млекопитающих девяти генов аденилаткиназы (*AKI-9*), корреляция между общей аденилаткиназной активностью и концентрацией ТТФ в мышцах крысы [50] может свидетельствовать о синтезе ТТФ одним из изоферментов аденилаткиназ, отличным от кодируемого *AKI*.

В митохондриях мозга показан синтез ТТФ из ТДФ и неорганического фосфата в присутствии субстратов дыхательной цепи [37]. Данная реакция ингибируется разбавителями и ингибиторами  $F_0F_1$ -АТР-синтазы. В связи с этим было высказано предположение, что ТТФ может синтезироваться с помощью хемиосмотического механизма, используемого для синтеза АТР (реакция 6, рис. 1). У *Escherichia coli* с каталитически неактивной АТР-синтазой образование ТТФ не происходит, тогда как синтез ТТФ восстанавливается при наличии плазмиды, содержащей оперон для кодирования субъединиц  $F_0F_1$ -АТР-синтазы [51]. Тем не менее авторы не смогли продемонстрировать такой синтез *in vitro* с использованием очищенной  $F_0F_1$ -АТР-синтазы, несмотря на функциональную активность фермента в реакции синтеза АТР. Таким образом, вопрос о ферменте, катализирующем синтез ТТФ из ТДФ и фосфата в митохондриях мозга, остается открытым.

Поддержание низкой стационарной концентрации ТТФ ( $< 10^{-6} \text{ М}$ ) осуществляется путем его гидролиза с помощью тиаминтрифосфатазы (ТТФазы; реакция 7, рис. 1). Существуют две формы ТТФазы: растворимая и связанная с мембраной, однако на молекулярном уровне охарактеризована лишь растворимая ТТФаза (ЕС 3.6.1.28, ген *THTPA*). Данный белок состоит из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 25 кДа. Каталитическая эффективность растворимой ТТФазы достаточно высока,  $k_{\text{cat}}/K_m$  варьирует в диапазоне  $10^6\text{--}10^7 \text{ с}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$  (оптимум pH 8,9), фермент обладает высокой специфичностью к ТТФ [52]. Мембранная ТТФаза не была идентифицирована на молекулярном уровне [53], но ряд ее биохимических свойств отличался от характеристик растворимого фермента. Данный фермент обладал низким сродством к ТТФ ( $K_m = 1,5 \text{ мМ}$ ) и ингибировался АТР и АДФ ( $K_i$  20 и 75 мкМ соответственно) [53].

В мышечной ткани было показано существование обратной корреляции между растворимой ТТФазной активностью и уровнем ТТФ у различных классов животных [19]. В связи с этим можно предположить, что данный фермент играет ключевую роль в регуляции содержания ТТФ в тканях млекопитающих. В меланоме экспрессия растворимой ТТФазы отрицательно коррелирует с экспрессией опухолевого антигена — меланотрансферрина (p97) [54], что указывает на связь уровня ТТФ со злокачественной трансформацией.

В клетках животных было идентифицировано и аденилированное производное тиаминтрифосфата, АТТФ [20]. Данное соединение, структурно сходное с регулятором трансляции диаденозинтетрафосфатом, обладает свойствами сигнальной молекулы [27]. Предполагают, что синтез АТТФ осуществляется из основного компонента тиаминового пула клетки, ТДФ, ферментом ТДФ-аденилтрансферазой [19]. Однако механизм реакции (реакция 8, рис. 1) остается неясным даже в части того, является ли донором переносимого на ТДФ фосфатного остатка АДФ или АТР. Предполагается, что низкая стационарная концентрация АТТФ, подобно ТТФ, поддерживается его ферментативной деградацией с образованием кофермента ТДФ (реакция 9, рис. 1). В мембране *E. coli* локализован фермент, катализирующий гидролиз АТТФ до ТДФ и АМР [20]. Показано, что у бактерий АТТФ синтезируется из ТТФ в ответ на метаболический стресс [20]. Наряду с АТТФ идентифицировано также дифосфорное аденилированное производное тиамин — АДДФ [20], которое может быть побочным продуктом синтеза АТТФ (реакция 10, рис. 1). Следует отметить, что идентификация специфических ферментов метаболизма и белков-мишеней таких минорных компонентов тиаминового пула помогает разрешить и существующую в литературе дискуссию о том, являются ли такие метаболиты синтезируемыми в ответ на клеточный стресс регуляторами (т.е. «алармонами») или их появление в таких условиях — неспецифический артефакт метаболического стресса.

Помимо превращений фосфорилированных производных, представленных на рис. 1, известны ферменты расщепления тиамин — тиаминазы. Тиаминаза I переносит аминопиримидиновую часть тиамин на органические соединения-акцепторы [55]. В частности, тиаминаза I может катализировать замену поврежденного тиазолиевого кольца на новое. Тиаминаза II (тиаминаза TenA) катализирует расщепление молекулы тиамин на два составляющих его гетероцикла [55, 56]. Оба фермента обеспечивают

реутилизацию тиамин из его поврежденных форм. Биологическая роль тиаминазы II в реутилизации тиамин подтверждается в 100 раз большей эффективностью гидролиза одного из продуктов деградации тиамин, 4-амино-5-аминометил-2-метилпиримидина, по сравнению с гидролизом самого тиамин [56].

На молекулярном уровне тиаминазы идентифицированы в основном у бактерий, и их существование у млекопитающих не является общепризнанным. Однако у мышей, которым вводили [<sup>35</sup>S]тиамин, была показана быстрая деградация тиамин до его аминопиримидинового и тиазолового гетероциклов [57]. Продукты превращения введенного тиамин зависели от дозы тиамин и типа исследуемой ткани. Так, в мозге наблюдали 1,5-кратный рост содержания 5-(2-гидроксиэтил)-4-метилтиазол и 1,3-кратный — тиаминфосфатов. В печени такое же увеличение тиаминфосфатов сопровождалось двукратным увеличением продукта окисления тиамин — тиохрома (рис. 2). В независимых исследованиях было показано, что в моче после перорального и парентерального введения тиамин крысам детектируется другой катаболит тиамин — 4-метилтиазол-5-уксусная кислота [57, 58]. Таким образом, введение высоких доз тиамин может сопровождаться значительным накоплением продуктов его деградации. Не исключено, что они также могут иметь физиологическое действие. Например, известный седативный препарат геминейрин (хлорметиазол, 5-(2-хлорэтил)-4-метилтиазол) — агонист GABA<sub>A</sub>-рецептора — является структурным аналогом тиазолового фрагмента тиамин.

Обладающие тиаминазной активностью белки выделены из насекомых (*Anophe* spp.) [59] и рыб [60]. Наличие такой активности может вызывать дефицит тиамин при культуре питания, связанной с употреблением в пищу сырой рыбы [61]. Гомогенный препарат тиаминазы I был получен из печени карпа, для которой была определена последовательность 20 N-концевых аминокислот: DKLPSLIKMNNDFAFHLYKR [60]. Хотя при публикации этого исследования в 2000 г. не было известно ни одного гена, кодирующего такую последовательность, на данный момент этот пробел восполнен. С помощью биоинформатического поиска в базах данных мы обнаружили, что в геномах карпа и *Danio rerio* существует до трех дублированных генов, которые могут кодировать тиаминазу I. В настоящее время эти гены аннотированы как изоформы серпинов — белков, подобных кортикостероид-связывающему глобулину (транскортину). Таким образом, тиаминазу I карпа [60] можно считать одним из белков семейства серпинов.



Учитывая возможность деградации тиамин в организме млекопитающих [57, 58], можно предположить, что тиаминная активность присуща одному или нескольким белкам, кодируемым генами серпинов млекопитающих. Мы сравнили опубликованные последовательности генов тиаминазы I карповых рыб [60] с гомологами из семейства серпинов млекопитающих. Проведенный анализ показал, что N-концевой участок обладающего тиаминной активностью фермента карпа располагается внутри последовательностей хорошо охарактеризованных серпинов. Поэтому вполне возможно, что тиаминная активность появляется в результате посттрансляционного протеолиза, характерного для серпинов [62]. Наличие в организме человека серпинов, потенциально обладающих активностью тиаминаз, заслуживает внимания с точки зрения нейродегенеративных заболеваний, сопряженных с развитием дефицита тиамин.

Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что на настоящий момент на молекулярном уровне идентифицированы далеко не все ферменты метаболизма тиамин млекопитающих. В частности, недостаточно охарактеризованы ферменты синтеза и функции сигнальных молекул – ТТФ, АТТФ, АТДФ, а также тиаминная активность тканей млекопитающих. Учитывая значение тиамин и его природных производных для регуляции метаболизма, ферменты метаболизма тиаминных соединений могут быть потенциальными мишенями терапевтических воздействий, однако для этого требуется их дальнейшая идентификация на молекулярном уровне.

## ТРАНСПОРТ ТИАМИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

В водных растворах тиамин заряжен положительно, а его фосфорные производные – отрицательно. Поэтому транспорт всех форм тиамин через биологические мембраны требует соответствующих транспортеров и может быть использован для регуляции метаболизма на уровне экспрессии этих транспортеров [10, 24]. Детальная характеристика транспорта тиамин и ТМФ имеет специфическое значение для мозга, поскольку лишь эти соединения проникают в мозг посредством активного транспорта через гематоэнцефалический барьер [7, 34].

Нарушения транспорта тиамин в кровь из кишечника можно выявить по пониженному содержанию тиамин в крови, которое приводит к развитию синдрома Вернике–Корсакова. В по-

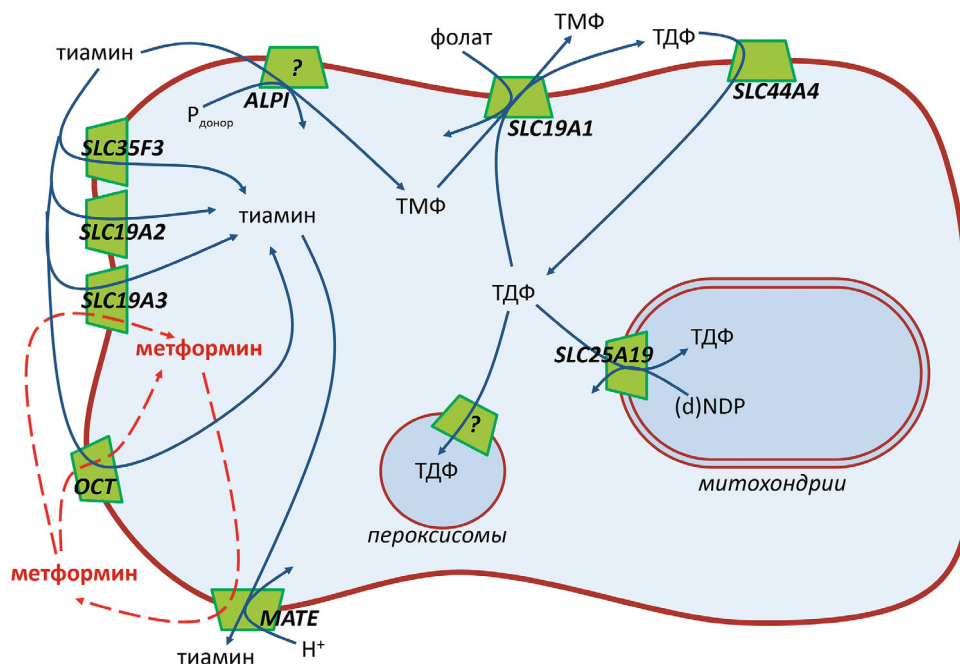
следнее время симптомы данного заболевания часто наблюдаются у пациентов, подвергшихся бариатрической хирургии, химио- и радиотерапии [63]. Однако внутриклеточный дефицит тиамин может возникать и при нормальном уровне тиамин в крови вследствие дисфункции клеточных транспортеров тиамин. Такие дисфункции могут возникать при мутациях генов транспортеров тиамин или за счет конкуренции тиамин с различными ксенобиотиками.

Постгеномные технологии позволили идентифицировать ряд новых транспортеров тиамин и его производных в дополнение к ранее известным из биохимических исследований. Нарушение работы этих транспортеров может приводить к дефициту тиамин не только в целом организме, но и в отдельных его тканях и клетках. Благодаря наличию альтернативных транспортеров тиамин и/или неполной потере функции при мутации негативный эффект таких мутаций зачастую остается не идентифицированным в нормальных условиях, но может проявиться при патологических и/или терапевтических воздействиях. В этих случаях может потребоваться прием высоких доз тиамин. Поэтому идентификация генов транспорта тиамин является актуальной задачей персонализированной медицины.

У млекопитающих хорошо охарактеризованы клеточные транспортеры тиамин THTR-1 ( $K_m = 2,5 \cdot 10^{-6}$  М) и THTR-2 ( $K_m = 2,7 \cdot 10^{-8}$  М), кодируемые генами *SLC19A2* и *SLC19A3* соответственно (рис. 3) [64, 65]. При мутациях гена *SLC19A2* развивается синдром тиамин-зависимой мегалобластной анемии, сопровождающийся диабетом и необратимой потерей слуха [66]. Транспортер THTR-1 также идентифицирован как входной рецептор для вируса лейкоза кошачьих (*Feline leukemia virus*), связывание которого с транспортером THTR-1 (*SLC19A2*) нарушает вход тиамин в клетку [67]. Мутации гена *SLC19A3* приводят к симптомам, схожим с синдромом Лея [68, 69]. Полиморфизм в недавно аннотированном транспортере тиамин, кодируемом геном *SLC35F3*, ассоциирован с гипертензией у человека и меньшим содержанием тиамин в эритроцитах [70].

Транспортер ТДФ, кодируемый геном *SLC25A19*, локализован в митохондриальной мембране и предназначен для переноса синтезируемого лишь в цитоплазме ТДФ в митохондрии (рис. 3). Он обладает значительной гомологией с митохондриальным ADP/АТФ-антипортером, что соответствует структурному сходству тиамин с нуклеотидами. Мутации данного транспортера приводят к дефициту ТДФ в митохондриях и дисфункции митохондриальных





**Рис. 3.** Клеточный транспорт тиамин и его производных. Транспортёры, идентифицируемые по названиям генов или семейства генов, показаны в виде трапеций, транспорт тиамин и производных – сплошными стрелками, транспорт метформина – пунктирными стрелками; (d)NDP – (дезокс)нуклеотиддифосфат. С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

ТДФ-зависимых ферментов. Характерные фенотипы данных мутаций – микроцефалия и билатеральный некроз [71]. Неоднозначность физиологических последствий дефицита тиамин и/или ТДФ, возникающего при дисфункции специфических транспортеров, свидетельствует в пользу существования тканеспецифических механизмов действия тиаминовых соединений, дополняющих универсальную роль ТДФ как кофермента центрального метаболизма.

Аналогично митохондриям, пероксисомы не обладают тиаминдифосфокиназной активностью, что указывает на необходимость импорта синтезируемого в цитоплазме ТДФ (рис. 3) для 2-гидроксифитаноил-КоА-лиазы, ТДФ-зависимого фермента пероксисом, кодируемого геном *HACL1* [72]. В связи с отсутствием идентификации пероксисомального транспортера ТДФ была высказана гипотеза о совместной транслокации белка *HACL1* и ТДФ в виде холофермента [72]. Тем не менее существование нескольких паралогов гена транспортера ТДФ *SLC25A19* в организмах эукариот позволяет предположить, что функцией одного из них вполне может быть транспорт ТДФ в пероксисомы (рис. 3).

На плазматической мембране клетки также локализован транспортер ТДФ из семейства холиновых транспортеров, кодируемый геном

*SLC44A4* (рис. 3). Экспрессия этого транспортера относительно высока в клетках кишечного эпителия, где он, по-видимому, используется для захвата ТДФ, получаемого с пищей и синтезируемого симбиотическими микроорганизмами [73].

Относительно недавно была показана возможность транспорта тиамин с  $K_m \sim 10\text{--}60 \text{ мкМ}$  через плазматические транспортеры из семейства переносчиков органических катионов (ОСТ), кодируемых генами *SLC22A1* (ОСТ1) и *SLC22A2* (ОСТ2) (рис. 3) [74–76]. Следует отметить, что величины  $K_m$ , характерные для рекомбинантных транспортеров человека и мыши ОСТ1 и ОСТ2, находятся в субмиллимолярном интервале и составляют 0,5–0,8 мМ [75]. Такие величины на порядок выше  $K_m$ , полученных в исследовании клеток со сверхэкспрессией нативного ОСТ2 [76]. Тем не менее высокие значения  $K_m$  рекомбинантных белков ОСТ1 и ОСТ2 частично компенсировались значительно более высокой величиной максимальной скорости транспорта ( $V_{max}$ ) по сравнению с высокоаффинным транспортером тиамин, кодируемым геном *SLC19A2* [75].

Выход ТМФ и ТДФ из клетки возможен в обмен на фолат через переносчик RFC1, кодируемый геном *SLC19A1*, который известен как внутриклеточный транспортер фолата (рис. 3)

[77]. В экспорте тиамин могут участвовать и белки, транспортирующие различные токсины и лекарства из клеток. К ним относятся белки семейства MATE: MATE1 (*SLC47A1*) и MATE2-K (*SLC47A2*) (рис. 3). Величины  $K_m$  этих транспортеров для тиамин составляют 3,5 и 3,9 мкМ соответственно [76, 78], подтверждая физиологическую значимость осуществляемого ими транспорта тиамин.

Изменения транспорта тиамин при злокачественной трансформации хорошо согласуются с ключевой ролью тиаминных соединений в регуляции метаболизма. Так, экспрессия транспортера, кодируемого геном *SLC19A3*, понижена в клетках и опухолях рака молочной железы по сравнению с нормальной тканью [79]. Снижение уровня экспрессии *SLC19A3* было обнаружено также в клетках и опухолях рака желудка [80] и в линиях клеток рака прямой кишки [81]. Установлено, что подобное снижение экспрессии *SLC19A3* при данных типах рака вызвано эпигенетическими механизмами — деацетилированием гистонов и гиперметилированием ДНК в промоторной области гена [80, 81]. Сравнение опухолевых и контрольных тканей молочной железы также показало увеличение экспрессии другого высокоаффинного транспортера тиамин (*SLC19A2*), митохондриального транспортера ТДФ (*SLC25A19*) и фермента тиаминдифосфокиназы (*TPK1*) [82]. Значительное увеличение тиаминного пула и уровня экспрессии *SLC25A19* наблюдали в клетках нейробластомы N2A по сравнению с астроцитами [83]. Таким образом, независимые данные, полученные на клетках и опухолях разных типов рака, подтверждают изменения внутриклеточного транспорта тиамин при злокачественной трансформации. Существенность тиамин для пролиферации раковых клеток подтверждена, в частности, с использованием препаратов бактериальной тиаминазы I, показавших положительные результаты в борьбе с лейкемией [84].

Следует подчеркнуть, что определяемые тиаминном изменения экспрессии генов при злокачественной трансформации не обязательно связаны лишь с ТДФ-зависимыми ферментами. В частности, сверхэкспрессия транспортера, кодируемого геном *SLC19A3*, в клетках рака молочной железы ассоциирована с увеличением экспрессии гена цитохрома P450 *CYP4B1* и уменьшением уровня экспрессии фактора TFF1 и ингибитора диссоциации GDP Rho-белков, причем депривация тиамин имела обратное действие на экспрессию этих генов [85]. Таким образом, регуляция жизнедеятельности раковых клеток тиамином осуществляется не только за счет коферментной функции ТДФ.

### КОНКУРЕНЦИЯ ТИАМИНА И МЕТФОРМИНА ЗА ОБЩИЕ ТРАНСПОРТЕРЫ МОЖЕТ ВЫЗЫВАТЬ ГИПОВИТАМИНОЗ ТИАМИНА

Возможность транспорта тиамин и ксенобиотиков через одни и те же переносчики может быть причиной побочных эффектов лекарственных препаратов. Так, показано, что широко применяемый для лечения диабета препарат метформин (рис. 4) конкурирует с тиамином за транспортеры, осуществляющие перенос как тиамин, так и метформин (рис. 3). По-видимому, это связано с катионной природой обоих соединений (рис. 1 и 4). Поскольку прием метформин обычно продолжается ежедневно в течение длительного времени, в долгосрочной перспективе такая конкуренция может нарушать нормальное содержание тиамин в тканях и приводить к развитию тиаминного гиповитаминоза вплоть до дефицита. При этом скрытые дисфункции транспортеров тиамин, обусловленные полиморфизмом или мутациями генов, могут служить отягощающим фактором, приводящим к различиям в индивидуальной чувствительности пациентов к такому побочному эффекту метформин. Возникающий вследствие приема метформин гиповитаминоз тиамин может усугубить проблемы, вызванные диабетом, провоцируя развитие других патологий, таких как нейродегенеративные заболевания. Идентификация конкуренции между транспортом тиамин и метформин является ярким примером преимуществ фундаментальных исследований молекулярных механизмов транспорта и действия лекарственных препаратов по сравнению со скрининговыми исследованиями. Скрининг, осуществляемый в фиксированных условиях и по ограниченному набору целевых параметров, выбранных для оценки фармакологического действия соединения, не может заменить изучение молекулярных механизмов действия препарата. В частности, исследования транспорта *in vitro* позволяют получить параметры, необходимые для предварительной оценки и моделирования процессов взаимодействия лекарственных препаратов с нормальным метаболизмом *in vivo*.

Таким образом, основными клеточными транспортерами тиамин считаются высокоаффинные транспортеры THTR-1 и THTR-2, кодируемые генами *SLC19A2* и *SLC19A3*, экспрессируемые практически во всех тканях (рис. 3). В то время как существенного транспорта метформин через THTR-1 (*SLC19A2*) не наблюдается, для транспортера тиамин THTR-2 (*SLC19A3*) установлена способность переносить

также и метформин [86]. При этом как конкурентный транспорт, так и вызываемое метформином ингибирование ТНТР-2 нарушают нормальный вход тиамина в клетки в присутствии метформина (рис. 3) [86].

С другой стороны, физиологическое значение поступления тиамина в клетку было также показано для известных переносчиков метформина — транспортеров органических катионов ОСТ1 и ОСТ2 (рис. 3) [74–76, 87]. Для этих транспортеров характерна узкая тканеспецифичность экспрессии: ОСТ1 экспрессируется в печени, а ОСТ2 — в почках. Таким образом, ОСТ1 и ОСТ2 могут обеспечивать тканеспецифическую регуляцию абсорбции тиамина в печени и почках. Действительно, нокаут ОСТ1 (*SLC22A1*) у мышей нарушает метаболизм глюкозы и приводит к ингибированию ТДФ-зависимых ферментов, в частности ПДГК, что совпадает с фенотипом контрольных мышей при диете без тиамина [88].

Сравнение кинетических параметров ОСТ1 и ОСТ2 в отношении метформина позволило сделать заключение о значительно большей эффективности переноса метформина транспортером ОСТ2 по сравнению с ОСТ1 *in vivo* [87]. В сверхэкспрессирующих ОСТ1 клетках метформин полностью ингибировал транспорт тиамина через ОСТ1 [75]. С учетом того, что константа ингибирования ОСТ1 метформином ( $K_i = 1,4$  мМ) намного выше таковой для другого бигуанида — фенформина ( $K_i = 0,07$  мМ) [75], можно предположить усиление побочного эффекта на транспорт тиамина при использовании фенформина. Кроме того, по сравнению с ОСТ1 ингибирование метформином ОСТ2 характеризуется вдвое меньшей величиной  $K_i$  [89]. На основании этих данных и приблизительно одинаковых параметров транспорта тиамина через ОСТ1 и ОСТ2 [75] можно предположить, что метформин будет сильнее ингибировать транспорт тиамина через ОСТ2, чем через ОСТ1. Конкуренция тиамина и метформина при их транспорте через ОСТ1 и ОСТ2 должна снижать эффективность насыщения клеток данными соединениями при их совместном действии. Поскольку печень является органом, в котором тиамин запасается и расходуется по мере необходимости [90], ингибирование ОСТ1 метформином, назначаемым при диабете, способно нарушать запасающую функцию печени в отношении тиамина, способствуя развитию гиповитаминоза тиамина вплоть до сильного дефицита. Этим могут объясняться побочные эффекты метформина на организм в целом. Однако клинические исследования также показали, что токсическое действие метформина на печень ог-



Рис. 4. Структурные формулы метформина и наиболее известных антагонистов тиамина

раничено отдельными случаями [91], тогда как токсическое действие метформина на почки широко распространено [92]. Данные результаты хорошо согласуются с приведенными выше величинами  $K_i$  ОСТ1 и ОСТ2 метформином и тканеспецифичностью экспрессии этих транспортеров. Так, преимущественно почечная экспрессия ОСТ2, обладающего более низкой по сравнению с ОСТ1  $K_i$  в отношении метформина, должна приводить к более сильному нарушению транспорта тиамина в почках, чем в печени. Соответственно, в почках может возникать и более острый тиаминный дефицит, что хорошо соответствует клиническим наблюдениям более распространенного токсического действия метформина на почки по сравнению с печенью.

Побочные эффекты метформина в почках и печени, включая развитие лактатного ацидоза, были также ассоциированы с дисфункцией MATE1 — еще одного белка, способного транспортировать тиамин (рис. 3) [93]. Транспортеры семейства MATE, в т.ч. обладающие высоким ( $10^{-6}$  М) сродством к тиамину MATE1 (*SLC47A1*) и MATE2-K (*SLC47A2*) [76, 78], участвуют в секреции токсинов и лекарств (включая метформин) в печени и почках. Транспорт катионов через MATE происходит в обмен на протон, а направление транспорта задается за счет pH, поэтому работа данных переносчиков может приводить к выведению тиамина с желчью или мочой (рис. 3). Поскольку MATE1 обладает более высоким сродством к метформину по сравнению с MATE2-K [78], его дисфункция [93] приводит к существенному нарушению выведения метформина из организма, способствуя проявлению побочных эффектов.

В ряде клинических исследований при применении метформина и его аналогов у пациентов отмечали возникновение лактатного ацидоза. Поскольку лактатный ацидоз является общим индикатором побочного действия метформина [94] и дефицита тиамина [95], такие исследова-



ния служат дополнительным подтверждением физиологического значения конкуренции бигуанидов и тиамин за общие транспортеры. Более того, знание молекулярного механизма возникновения побочных эффектов позволяет предотвратить такие эффекты. Например, при применении буформина, аналога метформина, наблюдали острый лактатный ацидоз при пониженном содержании тиамин в плазме крови, а введение лекарственной формы тиамин с повышенной мембранной проницаемостью — фурусултиамин — способствовало быстрому исчезновению лактатного ацидоза и повышению уровня тиамин в плазме крови [96].

В ряде клинических исследований отмечали и другие симптомы дефицита тиамин на фоне приема метформин [97, 98] и буформин [96]. Так, диета с низким содержанием тиамин, прием пациентом 2 г метформин в день вместо рекомендованной дозы в 1 г и процедура гемодиализа из-за болезни почек вызывали острую энцефалопатию и симптомы, свойственные болезни Паркинсона, сопровождавшие развитие тиаминного дефицита [97]. Отмена метформин способствовала исчезновению данных симптомов при нормализации уровня тиамин в плазме крови [97]. В другом исследовании, продемонстрировавшем положительный эффект высокой дозы тиамин при эссенциальном треморе, пациент принимал метформин (500 мг 2 раза в день) на протяжении десяти лет [98]. Метформин является широко используемым лекарством при диабете второго типа, и вполне вероятно, что ингибирование транспорта тиамин метформин может быть одним из факторов, обуславливающих распространенность тиаминного дефицита среди больных диабетом второго типа [99]. Разная степень выраженности данного побочного эффекта бигуанидов у пациентов может зависеть от уровня тиамин в организме, который определяется питанием, микрофлорой и всасыванием в кишечнике, а также сопутствующими назначениями диуретиков и гемодиализа. Кроме того, степень тиаминного гиповитаминоза может зависеть и от генетической вариабельности других компонентов системы метаболизма тиамин, потенциально влияющей на насыщение тканей тиамин и его производными в условиях конкуренции с бигуанидами.

Таким образом, конкуренция бигуанидов, включая наиболее широко применяемый метформин, и тиамин за транспортеры THTR-2, OCT1, OCT2, MATE1 и MATE2-K может приводить к развитию разной степени тиаминного гиповитаминоза вплоть до тиаминного дефицита и лежать в основе ряда побочных эффектов

метформин. Рассмотренный пример конкуренции тиамин и лекарств за белки-переносчики и клинические последствия такой конкуренции указывают на актуальность исследований транспорта тиамин *in vivo*, в который, согласно последним исследованиям, могут быть вовлечены не только давно известные транспортеры. Полученные данные также показывают значительный уровень недооценки встречаемости тиаминного дефицита в развитых странах и необходимость внедрения в медицинскую практику анализа содержания тиамин у пациентов. Несмотря на то что существующие аналитические методы позволяют эффективно определять уровень тиамин в плазме крови, в большинстве стран такие анализы обычно не включены в оплачиваемый медицинским страхованием набор исследований.

### СИНТЕТИЧЕСКИЕ И ПРИРОДНЫЕ АНТАГОНИСТЫ ТИАМИНА

Антагонистами тиамин являются соединения, блокирующие процессы, которые зависят от тиамин. Синтетические антагонисты тиамин были внедрены в исследовательскую практику в качестве средств изучения физиологической роли ТДФ-зависимых ферментов в различных тканях и при злокачественной трансформации, а также для изучения метаболизма и транспорта тиамин и его производных. Широко известными антагонистами тиамин являются 4'-окситиамин, пиритиамин и ампролиум (рис. 4). Все три антагониста блокируют коферментную функцию тиамин (рис. 1), однако молекулярные механизмы их действия различаются [7]. Ампролиум, подобно метформину, подавляет транспорт тиамин внутрь клеток, вызывая дефицит внутриклеточного тиамин и, как следствие, образующегося из тиамин ТДФ. В моделях тиаминного дефицита на мышах показано, что ампролиум вызывает более медленное развитие тиаминного дефицита по сравнению с пиритиамин, широко применяемым для создания тиаминного дефицита [100].

Пиритиамин (рис. 4) блокирует фосфорилирование тиамин до ТДФ (рис. 1), создавая внутриклеточный дефицит кофермента ТДФ за счет сильного ингибирующего действия на тиаминдифосфокиназу [7]. При этом транспорт тиамин в клетку непосредственно не блокируется, но может нарушаться из-за снижения мембранного градиента концентрации тиамин при ингибировании его внутриклеточного превращения в ТДФ. Хотя ингибирование тиаминдифосфокиназы считается основным при создании



животных моделей тиаминного дефицита, индуцируемого пиритиамином, показано также использование пиритиамина тиаминдифосфокиназой в качестве субстрата [7, 10]. Данная реакция протекает с низкой эффективностью из-за очень прочного связывания пиритиамина с ферментом, однако фосфорилирование пиритиамина может иметь физиологическое значение. Об этом свидетельствует имитирующее ТДФ действие пиритиамина в качестве рибопереклочателя у микроорганизмов, доказывающее продукцию из пиритиамина *in vivo* аналога ТДФ – дифосфата пиритиамина [7, 10]. Тем не менее общепризнанным субстратом тиаминдифосфокиназы является не пиритиамин, а другой антагонист тиамин – 4'-окситиамин (рис. 4). Образование *in vivo* дифосфорилированной формы 4'-окситиамина (4'-оксиТДФ), блокирующей ферменты центрального метаболизма, которые используют ТДФ в качестве кофермента, является основным механизмом реализации антиметаболического действия окситиамина. 4'-ОксиТДФ также способен имитировать функцию ТДФ как рибопереклочателя [101].

В силу ключевого положения ТДФ-зависимых ферментов в центральных метаболических путях практически любой физиологический эффект антагонистов тиамин может быть объяснен нарушением энергетического метаболизма. Тем не менее во многих случаях обнаруженные эффекты можно интерпретировать и как свидетельства в пользу некоферментного действия тиамин и/или производных. Например, при действии 4'-окситиамина наблюдали увеличение кальций-зависимого высвобождения синаптического ацетилхолина [102]. Поскольку ингибирование пируватдегидрогеназы 4'-оксиТДФ должно уменьшать содержание ацетилхолина в связи с уменьшением продуцируемого ПДГК предшественника ацетилхолина – ацетил-КоА, результат, полученный Hirsch и Parrott [102], указывает на некоферментный характер действия 4'-окситиамина, аналогичный действию тиамин по усилению ацетилхолинергической нейротрансмиссии, которое наблюдали Minz и von Muralt [29, 30]. В рамках рассмотрения исключительно коферментной роли тиамин и его антагонист, не имеющий каталитически важной 4'-аминогруппы, не могут вызывать один и тот же эффект. С учетом же некоферментного действия тиамин его высокое структурное сходство с 4'-окситиамином (рис. 1 и 4) вполне может обеспечить сходную регуляцию одних и тех же мишеней, связывающих тиамин по некоферментному типу. С другой стороны, с традиционной точки зрения высокий уровень синаптического ацетилхолина при действии 4'-окси-

тиамин может быть обусловлен недостатком энергии для обратного захвата ацетилхолина. Тем не менее специфическое ингибирование митохондриальных дегидрогеназ 2-оксокислот показало, что первоочередные физиологические эффекты такого ингибирования обусловлены не энергетическим дефицитом, а нарушением гомеостаза метаболитов, связанных с дегидрогеназами 2-оксокислот [10, 83, 103]. Данная особенность может быть обусловлена тем, что энергетический дефицит при ингибировании одного продуцента NADH может быть эффективно скомпенсирован другими NADH-продуцирующими реакциями, поскольку биосистемы настроены на стабилизацию энергетического обмена. Изменение же клеточных концентраций таких регуляторных метаболитов, как связанные с дегидрогеназами 2-оксокислот нейромедиаторы и/или их предшественники (глутамат,  $\gamma$ -аминомасляная кислота, ацетил-КоА), аналогичной компенсации не поддается, поскольку биосистемы используют данные изменения в сигнальных каскадах.

4'-Окситиамин и/или его фосфорилированные производные обнаруживаются *in vivo*, причем у различных организмов идентифицированы ферменты, которые детоксифицируют окситДФ [104, 105]. У микроорганизмов показана регенерация тиамин из 4'-окситиамина через тиаминсукцинат, однако на молекулярном уровне ферменты данного пути не были определены [104]. У бактерий, растений и дрожжей найдена гидролаза семейства NUDIX, которая обладает в 60 раз большей ферментативной активностью с 4'-окси- и 2-оксоТДФ по сравнению с ТДФ [105]. Ортологи этого фермента есть у рыб, амфибий и некоторых других хордовых. Хотя биологическая роль ферментов, детоксифицирующих «поврежденные» метаболиты, согласуется с детекцией 4'-окситиамина, в т.ч. в организме здоровых людей [106], у млекопитающих такие ферменты не охарактеризованы. Полагают, что биосинтез 4'-оксиТДФ из тиамин и/или его фосфатов может проходить путем спонтанного гидролиза 4'-аминогруппы тиамин либо под действием окислительного стресса [104, 105, 107]. Второй путь превращения 4'-аминогруппы тиамин в 4'-оксигруппу подтверждается накоплением в плазме крови и эритроцитах 4'-оксиТДФ при хронической болезни почек, ведущей к окислительному стрессу [106].

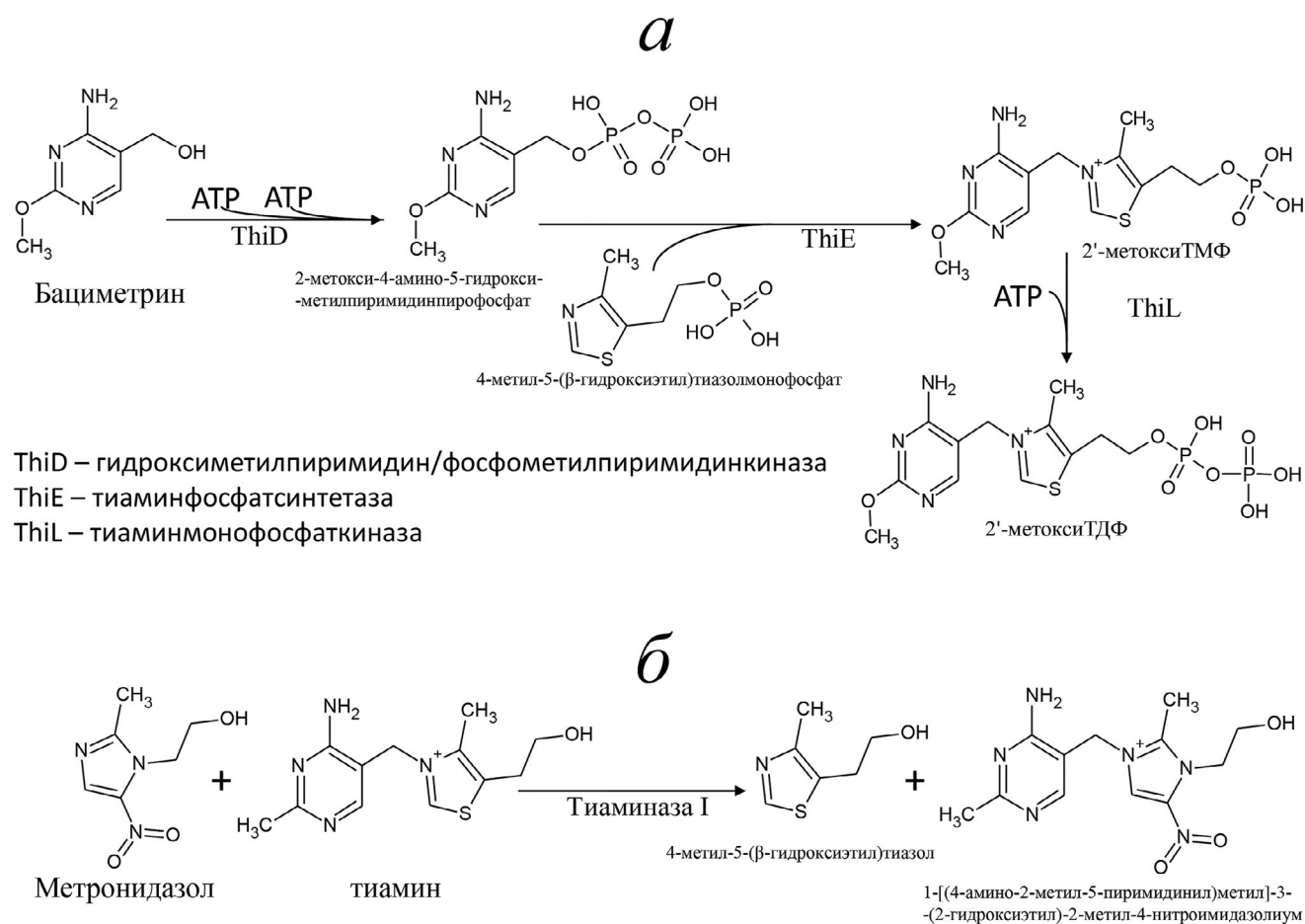
Таким образом, 4'-окситиамин и его производные являются природными антагонистами тиамин. Низкая концентрация данного производного в организме животных может поддерживаться за счет секреции с желчью и мочой при участии транспортеров MATE (рис. 3), для

которых показан транспорт тиамин [76, 78]. Возможно, что циркуляция секретируемого 4'-окситиамина в кровотоке способствует его детоксификации микробиотой кишечника, превращающей данный антагонист в тиамин за счет рассмотренных выше бактериальных ферментов.

Известен и другой природный антагонист тиамин, предшественником которого является недавно идентифицированный у некоторых бактерий антибиотик бациметрин (рис. 5). Имитируя аминопиримидиновое кольцо тиамин, бациметрин используется в качестве субстрата ферментами биосинтеза тиамин других бактерий и дрожжей. В итоге синтезируется антагонист ТДФ, 2'-метокситДФ, который подавляет жизнеспособность за счет блокирования ТДФ-зависимых ферментов (рис. 5) [108].

Подобным же образом из структурных аналогов составных частей тиамин могут образовываться антагонисты тиамин при действии тиаминазы I *in vivo*. Например, антибиотик мет-

ронидазол имитирует тиазольевый фрагмент тиамин и используется тиаминазой I бактерий для синтеза соответствующего аминопиримидин-имидазольевого аналога тиамин (рис. 5). Такой аналог эффективно ингибирует тиаминдифосфокиназу [109]. Недавно была показана индуцированная метронидазолом энцефалопатия по причине развития у пациента дефицита тиамин при приеме данного антибиотика [110]. По-видимому, синтезируемый микробиотой аминопиримидин-имидазольевый антагонист тиамин (рис. 5) в данном случае накапливался в токсических для человека количествах. Анти-витаминовый эффект метронидазола требует замены антибиотика, однако может быть устранен и с помощью приема высоких доз тиамин [110]. Определяемый действием тиаминазы I механизм развития тиаминного дефицита указывает на необходимость контроля уровня тиамин (или синтезируемого тиаминазой I антагониста тиамин) у пациентов, принимающих антибиотика, способные выступать в качестве субстра-



**Рис. 5.** Антагонисты тиамин, синтезируемые ферментами метаболизма тиамин бактерий. *a* – Механизм действия бациметрина в качестве антибиотика; *б* – образование антагониста тиамин при приеме метронидазола

тов тиаминазы I. Данный пример демонстрирует актуальность фундаментальных исследований соотношения структуры и функции ферментов, включающих характеристику детерминант субстратной специфичности и регуляции ферментов. Кроме того, не следует недооценивать вариабельность микробиоты как потенциальный фактор варьирующего воздействия на организм человека ксенобиотиков, способных подвергаться трансформации в кишечнике. Учитывая существование бактериального синтеза антагонистов тиамина, роль микробиоты в развитии тиаминового дефицита и сопряженных с ним патологий нуждается в дальнейшем изучении.

### БЕЛКИ-МИШЕНИ НЕКОФЕРМЕНТНОГО ДЕЙСТВИЯ ТИАМИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Структурные детерминанты белковых центров, взаимодействующих с ТДФ как коферментом, охарактеризованы достаточно хорошо благодаря идентификации большого количества таких белков. Знания о некоферментном типе связывания тиамина и его производных у животных ограничены в основном структурными исследованиями тиаминдифосфокиназы и ТТФазы. Это затрудняет поиск и функциональную аннотацию белков генома, потенциально связывающих тиаминовые соединения по некоферментному типу. Тем не менее некоферментный тип связывания установлен в ряде независимых биохимических экспериментов по изменению специфических функций белков, причем в некоторых случаях он был дополнен идентификацией потенциальных структурных детерминант образования соответствующих комплексов. Фрагментарность этих результатов, суммированных ниже, компенсируется биологической значимостью белков, охарактеризованных в качестве мишеней тиаминовых соединений, указывая на необходимость дальнейших исследований в данной области.

Показано, что *in vitro* ТДФ образует комплекс с регулятором транскрипции и онкосупрессором p53, ингибируя ДНК-связывающую активность p53 [23]. Дифосфатная группа ТДФ является существенной для взаимодействия ТДФ с p53, т.к. при прочих равных условиях ТМФ и тиамин связываются менее эффективно [23]. *In vitro* p53 также связывает ТДФ лучше, чем нуклеотиды ADP или NAD<sup>+</sup>. Таким образом, некоферментное связывание ТДФ может регулировать функции p53. Действительно, добавление к клеткам тиамина ингибировало ин-

дуцируемое радиацией связывание p53 с ДНК, тестируемое по экспрессии известных мишеней p53, белков hdm2 (Mdm2) и p21 [23]. С другой стороны, известна регуляция белком p53 транспорта тиамина и его производных. Так, p53 активизирует экспрессию тиаминового транспортера, кодируемого геном *SLC19A2* [24], и подавляет экспрессию транспортера RFC1, кодируемого геном *SLC19A1*, обменивающего фолат на ТМФ или ТДФ [111]. Поскольку оба эффекта обеспечивают увеличение содержания тиамина и его производных в клетке за счет транскрипционной активности p53, взаимодействие p53 с генерируемым в цитоплазме ТДФ может быть основой механизма обратной связи для регуляции клеточного уровня ТДФ. Зависимость регуляторного действия p53 от тиаминового пула клетки наблюдали в экспериментах на первичных культурах нейронов, в которых экспрессия p53 и Mdm2 увеличивалась в ответ на высокое атмосферное давление, а после добавления к клеткам тиамина уровень p53 и Mdm2 снижался [112]. В независимых экспериментах с трансформированными клеточными линиями нейронального и глиального происхождения инкубация с антагонистами тиамина 4'-окситиамином и пиритиамином приводила к опосредованному каспазой апоптозу, индуцируемому p53 [113]. Временные зависимости апоптоза в присутствии 4'-окситиамина и пиритиамина различались, что согласуется с существенной ролью дифосфатной группы ТДФ во взаимодействии с p53 и значительно более высокой эффективностью образования дифосфатного производного в случае 4'-окситиамина по сравнению с пиритиамином [10].

Аденилированный тиаминтрифосфат (АТТФ) *in vitro* ингибировал NAD<sup>+</sup>-зависимый фермент поли(ADP-рибозо)-полимеразу 1 (ПАРП), кодируемую геном *PAP1* [32]. Полное ингибирование рекомбинантного фермента наблюдали при концентрации АТТФ 10 мкМ [32], сравнимой с концентрацией АТТФ в клетках глиобластомы [19]. АТДФ, ТТФ, ТДФ и тиамин при концентрации 20 мкМ не влияли на активность фермента [32]. Модель комплекса АТТФ с ПАРП, полученная на основании разрешенной структуры белка с NAD<sup>+</sup> и кинетических данных о связывании АТТФ с этим белком, предполагает образование стэкинга тиазолиевого кольца АТТФ с Tyr907, расположенным непосредственно в каталитическом центре [32]. Данная модель объясняет механизм селективного ингибирования ПАРП АТТФ и отсутствие ингибирования ПАРП ТТФ или АТДФ. Модель структуры комплекса показывает, что для эффективного ингибирования необходимо связывание одновременно тиаминового и аденозино-

вого фрагментов, но меньшая длина молекулы АТДФ не позволяет осуществить такое связывание. Высокая селективность и низкая константа связывания АТДФ ПАРП, а также роль АТДФ в качестве алармона у бактерий [20] позволяют предположить, что АТДФ может быть физиологическим регулятором поли-ADP-рибозилирования («парилирования») – процесса, вовлеченного в ответ клеток на повреждения ДНК.

Тиамин и его производные взаимодействуют со связанным с мембраной прионным белком PRNP (прионом) [114, 115]. С помощью моделирования охарактеризовали структуру комплекса тиамина и его производных с прионом [114]. Для рекомбинантного приона  $K_d$  комплекса с тиамином и его моно- и дифосфатами варьирует в пределах 0,06–0,07 мМ [115]. В отличие от связывания ТДФ с р53 [23] или АТДФ с ПАРП [32], связывание с белком PRNP не зависит от фосфорилирования тиамина. Высказано предположение, что такое связывание может выполнять биологическую функцию сорбции тиаминных соединений в примембранном слое на внешней поверхности клетки для улучшения эффективности дальнейшего транспорта витамина В1 и его фосфатов в клетку [10, 114, 115].

Известно связывание тиамина с рецептором, кодируемым геном *TAS2R1*, принадлежащим к группе сопряженных с G-белками рецепторов горечи [116]. В независимом исследовании тиамин был охарактеризован как агонист неидентифицированного рецептора из группы *TAS2R* [117]. Эти данные согласуются с некоферментным действием тиамина в ацетилхолиновой нейротрансмиссии [29, 30, 102]. Показанное в опытах с 4'-окситиамином увеличение кальций-зависимого высвобождения синаптического ацетилхолина [102] может осуществляться за счет активации рецептора, кодируемого одним из генов группы *TAS2R*. Можно предположить, что такая активация инициирует сигнальный каскад, в результате которого открытие кальциевых каналов в конечном итоге усиливает выброс ацетилхолина. Таким образом, изучение вкусовых рецепторов представляет большой интерес с точки зрения некоферментной функции тиамина в ацетилхолинергической нейротрансмиссии.

В бактериальных геномах гены, кодирующие ферменты биосинтеза тиамина, соседствуют с геном *YajL*, что позволяет предположить общую регуляцию биосинтеза тиамина и *YajL* [118]. Бактериальный ген *YajL* является гомологом гена *DJ-1* (альтернативное название *PARK7*) человека, кодирующего паркин 7. Проведенный нами анализ выявил гомологию белков *YajL/DJ-1*

и белка биосинтеза тиамина, кодируемого геном *ThiD* (киназа гидроксиметилпиримидина/фосфометилпиримидина), на уровне их пространственных структур и функциональных остатков активного центра [10]. Таким структурным данным хорошо соответствует идентификация кодируемого *DJ-1* паркина 7 среди белков мозга крысы, связывающихся на носителе, модифицированном производным тиазолия [33]. В совокупности с известной ролью паркина в развитии болезни Паркинсона данные результаты позволяют предположить, что взаимодействие паркина 7 с тиамином и/или производными может вносить вклад в положительный эффект высоких доз тиамина, наблюдаемый у пациентов с болезнью Паркинсона [14].

Исследование связывания белков мозга на модифицированных тиамином или аналогом его тиазолиевой части носителях обнаружило, что значительная доля таких белков представлена пиридоксалькиназой, глутаматдегидрогеназой и малатдегидрогеназой [33]. Кинетический анализ взаимодействия очищенных препаратов пиридоксалькиназы, глутаматдегидрогеназы и изоформ малатдегидрогеназы с тиамином и его производными, а также биоинформатический поиск структурных элементов этих белков для связывания тиаминных соединений подтвердили регуляцию указанных ферментов тиаминными соединениями [33]. Впервые была показана регуляция глутаматдегидрогеназы и глутаминсинтетазы сигнальными формами тиамина – АТДФ и ТДФ, хорошо согласующаяся с синтезом ТДФ в ответ на аминокислотное голодание [33, 119].

Биоинформатический анализ белков мозга крысы, связывающихся на модифицированных тиамином или тиазолием носителях, идентифицировал категорию «ацетилирование» как общую особенность таких белков [33]. Поскольку необходимый для данной посттрансляционной модификации субстрат, ацетил-КоА, в митохондриях синтезируется с помощью ТДФ-зависимой реакции, катализируемой ПДГК, связь коферментной и некоферментной роли тиамина и его производных через ацетилирование белков создает дополнительные возможности для регуляции метаболизма. Ацетил- и сукцинил-КоА, продуцируемые ТДФ-зависимыми комплексами дегидрогеназ 2-оксокислот, участвуют в посттрансляционных модификациях ацетилированием и сукцинированием. Эти механизмы могут лежать в основе долговременных (8 недель) изменений аминокислотного профиля и ферментативных активностей мозга крыс, которые наблюдали в результате однократного введения высокой дозы тиамина [119, 120].



Взаимодействие с ТДФ по некоферментному типу было также показано для аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы [121]. Реакции, катализируемые этими аминотрансферазами, связывают между собой пируват, оксалоацетат, 2-оксоглутарат и глутамат – метаболиты, уровни которых могут регулироваться ТДФ через коферментное взаимодействие с ПДГК и ОГДГК и некоферментное (аллостерическое) действие тиаминовых соединений на малатдегидрогеназу, глутаматдегидрогеназу, глутаминсинтетазу и пиридоксалькиназу. В результате такого коферментного и некоферментного действия тиамин и/или производных оказывается возможной метаболическая регуляция ТДФ-зависимых и сопряженных реакций, обеспечивающая оптимальное в данных условиях распределение субстратов и продуктов этих реакций по пересекающимся метаболическим путям [33]. *In vivo* краткосрочная регуляция активности этих ферментов при связывании тиаминовых соединений [33] может дополняться долгосрочной регуляцией за счет как посттрансляционных модификаций, так и на уровне изменения транскрипции и трансляции генов, вовлеченных в метаболизм тиамин [103, 120]. Известными на данный момент регуляторами этих процессов являются микроРНК miR-155 [22] и транскрипционный фактор p53 [23].

Таким образом, независимые данные о существовании белковых центров связывания тиамин и производных, отличных от связывания ТДФ в качестве кофермента, позволяют заключить, что биологическая функция тиамин не ограничивается регуляцией ферментов, использующих ТДФ в качестве кофермента. Тиамин и его производные вовлечены в более широкий спектр механизмов регуляции метаболизма. Такие механизмы включают краткосрочную аллостерическую регуляцию белков тиаминовыми соединениями, дополненную долгосрочными механизмами регуляции экспрессии белков и их активностей на уровне транскрипции, трансляции и путем посттрансляционных модификаций.

### ТИАМИН И ПАТОЛОГИИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Работа мозга остро нуждается в активном катаболизме глюкозы, поэтому при гиповитаминозе тиамин важную роль в развитии патологий мозга имеет дисфункция ТДФ-зависимых ферментов и роль ТДФ как кофермента. Однако развитию нейродегенеративных болезней может способствовать также нарушение некофермент-

ных функций тиаминовых соединений. В этой связи значительно большего внимания заслуживает известная роль тиамин в стимуляции ацетилхолинергической нейротрансмиссии [29, 30], поскольку единственными признанными средствами для облегчения болезни Альцгеймера являются усиливающие ацетилхолинергический сигнал ингибиторы ацетилхолинэстеразы [122].

Хотя долгое время считалось, что экономически развитые страны давно победили проблему гиповитаминоза и дефицита тиамин, представленные в обзоре данные показывают, что такая проблема может быть вызвана не только плохим питанием, но и медицинскими вмешательствами. В результате классический тип алиментарного дефицита тиамин сменяется характерным для развитых стран дефицитом, провоцируемым побочным действием лекарств, хирургических вмешательств и радиотерапии. Причем побочное действие может быть опосредовано как различными белками-мишенями организма-хозяина, так и вариативностью состава кишечной микробиоты. Увеличение продолжительности жизни также вносит вклад в проблему гиповитаминоза В1, поскольку известно снижение уровня тиамин и его коферментной формы ТДФ в крови и тканях при старении [19]. Это может быть отягощающим фактором при развитии различных возрастных патологий мозга, включая нейродегенеративные заболевания. Результаты независимых исследований показывают, что для больных с нейродегенеративными заболеваниями характерны нарушения не только уровней тиамин и его производных в крови, но и нарушения метаболизма тиамин. В этой связи важно, с одной стороны, вовремя диагностировать наличие и причину дефицита тиамин, а с другой – быстро устранить его, основываясь на установленных молекулярных механизмах возникновения такого дефицита.

Большинство современных подходов к устранению дефицита тиамин основано на использовании синтетических фармакологических форм тиамин (рис. 6) с увеличенной биодоступностью и нейротропностью. Однако механизмы транспорта и метаболические пути, на которые действуют эти производные тиамин, охарактеризованы недостаточно, по крайней мере в открытой печати. Дисульфидные производные тиамин, такие как фурсултиамин или сульбутиамин, были синтезированы в качестве аналогов природного дисульфида аллителиамин (рис. 6) [123]. Липофильность данных форм тиамин определяет их высокую проницаемость через мембраны. Такие предшественники тиамин могут превращаться в тиамин после внутрикле-

точного восстановления дисульфидной связи. Другой класс фармакологических форм тиамин представлен S-ацилпроизводными открытого тиазольевого кольца тиамин. Одним из представителей этого класса является широко используемый бенфотиамин (рис. 6). В большинстве исследований его действие сравнивают с действием тиамин [124, 125], хотя бенфотиамин является аналогом ТМФ и потому вполне может оказывать эффекты, не наблюдаемые при введении тиамин [124]. В частности, мембранная кислая фосфатаза простаты, которая экспрессируется в нейронах спинальных ганглиев, дефосфорилирует и бенфотиамин, и ТМФ [43, 44]. Именно дефосфорилирование бенфотиамин, аналогичное дефосфорилированию ТМФ, может быть связано с положительным эффектом бенфотиамин при воспалительной и нейропатической болях, которые зависят от действия кислой фосфатазы [43, 44].

Существование белковых мишеней бенфотиамин, отличных от ТДФ-зависимых ферментов, объясняет и тот факт, что в ряде исследований положительные физиологические эффекты тиамин и бенфотиамин не сопровождаются ростом ТДФ в мозге [17, 126, 127]. Так, накопление  $\beta$ -амилоида при дефиците тиамин [128] можно объяснить метаболическими нарушениями за счет дисфункции ТДФ-зависимых фер-

ментов. Однако бенфотиамин уменьшает количество  $\beta$ -амилоида и улучшает когнитивную функцию без увеличения уровня ТДФ в мозге [17]. Данный результат не согласуется с представлением о том, что эффекты тиамин и аналогов на мозговую деятельность определяются исключительно коферментным действием ТДФ. В независимых исследованиях было показано, что бенфотиамин способствует и уменьшению продукции  $\beta$ -амилоида при инкубации с высокими концентрациями глюкозы клеток НЕК293, сверхэкспрессирующих предшественник  $\beta$ -амилоида [129]. В обоих экспериментах наблюдалось снижение активности киназы гликогенсинтазы, кодируемой геном *GSK3B*. При этом тиамин обладает структурным сходством с ингибиторами данной киназы, используемыми для борьбы с болезнью Альцгеймера [130]. Более того, в условиях, когда наблюдается увеличение уровня киназы, кодируемой геном *GSK3B*, например, в животной модели физиологического стресса с использованием хищника (predator stress), введение животным тиамин или бенфотиамин снижает экспрессию данного фермента, предотвращает индуцированное стрессом снижение нейрогенеза гиппокампа и улучшает когнитивные способности животных [127, 131]. Как и в других экспериментах, улучшение функций мозга в таких исследованиях сопро-

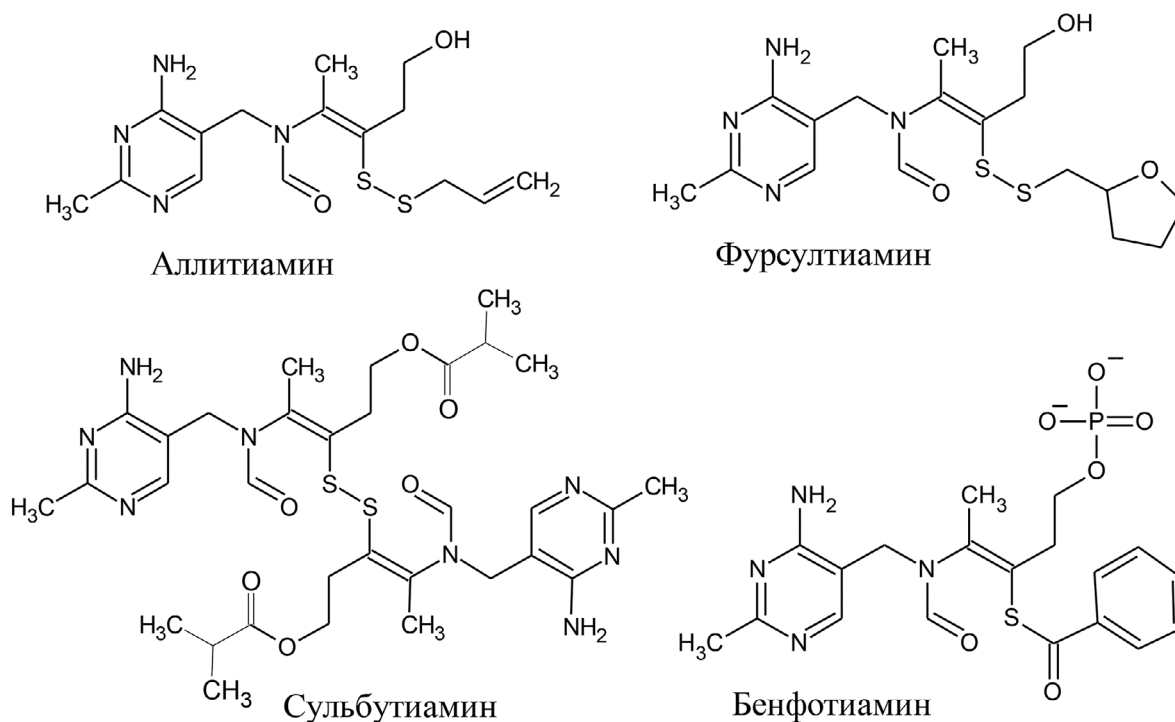


Рис. 6. Структурные формулы наиболее известных фармакологических форм тиамин

вождается ростом содержания в мозге тиамин, но не ТДФ [127]. Таким образом, отсутствие корреляции между уровнем кофермента ТДФ в мозге и положительными эффектами бенфотиамин свидетельствует в пользу некоферментного характера действия бенфотиамин и/или продуктов его метаболизма.

При болезни Альцгеймера понижены уровни тиамин в плазме крови [132], причем измерение уровней тиамин и его производных в крови имеет диагностическое значение [133]. При этом наблюдают существенное увеличение активностей ТМФазы и ТДФазы без изменения тиаминдифосфокиназной активности [134]. Ключевая роль ТМФазы и ТДФазы в нарушении метаболизма тиамин при болезни Альцгеймера подтверждается нарушением корреляции уровней ТМФ и ТДФ в плазме крови больных [134]. В целом, данные о патогенезе болезни Альцгеймера позволяют полагать, что тиаминный дефицит вследствие нарушения метаболизма тиамин может являться одной из причин болезни, запуская механизмы, способствующие окислительному стрессу и стрессу ЭПР, а также активации аутофагии [9].

При болезни Паркинсона также был обнаружен пониженный уровень тиамин в спинномозговой жидкости [135] и низкий уровень ТДФ-зависимого ОГДГК в черной субстанции, причем уменьшение ОГДГК коррелировало со степенью развития заболевания [136]. Получены свидетельства о роли потребления тиамин за несколько лет до диагностирования болезни Паркинсона в торможении развития данной болезни [137]. Показано, что в условиях падения активности ОГДГК, лимитирующего поток метаболитов через цикл трикарбонных кислот, нейрональные клетки и мозг животных увеличивают внутриклеточный транспорт тиамин [83]. Высокие дозы тиамин, снижающие выраженность симптомов болезни Паркинсона [14], могут усиливать эффективность такого компенсаторного ответа.

При травмах головного и спинного мозга, для которых характерно развитие воспалительных процессов и дисфункция антиоксидантной системы, показано положительное действие тиамин на ряд метаболических параметров мозга [138, 139]. Так, введение высокой дозы тиамин восстанавливает активности митохондриальных ферментов и дыхания, которые уменьшаются в результате травмы головного мозга [139], и способствует нормализации метаболизма глутатиона, содержание которого остается вдвое ниже нормы даже спустя восемь недель реабилитации после травмы спинного мозга [138]. Важную роль в этих процессах может играть описанное

выше некоферментное действие тиамин и его производных на ферменты метаболизма глутамата – глутаматдегидрогеназу, глутаминсинтетазу, трансминазы и синтезирующую кофермент трансминаз пиридоксалькиназу [33, 121]. Тиаминовая регуляция метаболизма глутамата может не только снижать нейротоксичность глутамата, но и способствовать увеличению синтеза глутатиона из глутамата. С другой стороны, активация р53 из-за травматического повреждения может увеличивать экспрессию TNFR-1 (*SLC19A2*), транспортирующего тиамин в клетки, и уменьшать экспрессию RFC1 (*SLC19A1*), транспортирующего ТДФ и ТМФ из клетки (рис. 3). В таких условиях введение в организм дополнительных количеств тиамин усилит повышение уровня ТДФ в травмированной ткани, необходимого для улучшения метаболизма. В свою очередь, связывание р53 с накопившимся ТДФ будет способствовать ослаблению сигнального каскада, индуцированного метаболическим стрессом.

Таким образом, патологии нервной системы, связанные как со старением (болезни Паркинсона и Альцгеймера), так и с травмами мозга, могут провоцироваться и/или усиливаться недостатком витамина В1. Применение высоких доз тиамин может иметь положительный эффект даже после диагностирования болезни. Результаты, полученные при введении в организм человека и животных тиамин или его фармакологических форм, не укладываются в представление об исключительно коферментной роли тиамин. Важную роль в нейропротекторном действии тиамин при патологии нервной ткани могут иметь как рассмотренные в данном обзоре, так и еще не идентифицированные белки-мишени и молекулярные механизмы некоферментного действия тиамин.

Несмотря на хорошо известные механизмы действия тиамин в качестве предшественника кофермента ТДФ, исследование метаболизма и функций тиамин у млекопитающих не теряет своей актуальности. Накопленные сведения о действии тиамин, его антагонистов и фармакологических форм указывают на важную роль не только коферментного, но и некоферментного связывания тиамин и производных с белками млекопитающих. В этой связи значительно большего внимания заслуживает тиаминовая регуляция онкосупрессора р53 и поли-(АДФ-рибозо)-полимеразы. Использование постгеномных подходов для идентификации белков, взаимодействующих с тиамин и его производными, необходимо для разработки диагностики и лечения ряда патологий, включаю-

ших и нейродегенеративные болезни. Охарактеризованные нарушения метаболизма тиамин у пациентов с болезнью Альцгеймера, как и давно известная некоферментная функция тиамин в ацетилхолинергической нейротрансмиссии, делают очевидной необходимость молекулярной идентификации белковых компонентов биосистем, вовлеченных в данные процессы. В частности, это касается белков, ответственных за метаболизм таких некоферментных производных тиамин, как ТМФ, ТТФ и АТТФ. Идентификация этих белков на молекулярном уровне будет ключевым шагом для решения ряда актуальных проблем, в их числе – функциональная аннотация геномов млекопитающих, функциональная диагностика мутаций для пер-

сонифицированной медицины и определение новых мишеней фармакологических воздействий для лечения нейродегенеративных заболеваний.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-34-00235).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания не опубликованных авторами результатов исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Stepuro, I.I., Oparin, A.Y., Stsiapura, V.I., Maskevich, S.A., and Titov, V.Y. (2012) Oxidation of thiamine on reaction with nitrogen dioxide generated by ferric myoglobin and hemoglobin in the presence of nitrite and hydrogen peroxide, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 41–55, doi: 10.1134/S0006297912010051.
- Parkhomenko, Y.M., Donchenko, G.V., Chehovskaya, L.I., Stepanenko, S.P., Mejenkaya, O.A., and Gorban, E.N. (2015) Metovitan prevents accumulation of thiamin diphosphate oxygenized form in rat tissues under irradiation, *Biotechnologia Acta*, **8**, 63–70, doi: 10.15407/biotech8.04.063.
- Coy, J.F., Dressler, D., Wilde, J., and Schubert, P. (2005) Mutations in the transketolase-like gene TKTL1: clinical implications for neurodegenerative diseases, diabetes and cancer, *Clin. Lab.*, **51**, 257–273.
- Langbein, S., Zerilli, M., Zur Hausen, A., Staiger, W., Rensch-Boschert, K., Lukan, N., Popa, J., Ternullo, M.P., Steidler, A., Weiss, C., Grobholz, R., Willeke, F., Alken, P., Stassi, G., Schubert, P., and Coy, J.F. (2006) Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted, *Br. J. Cancer*, **94**, 578–585, doi: 10.1038/sj.bjc.6602962.
- Meshalkina, L.E., Druitsa, V.L., Koroleva, O.N., Solovjeva, O.N., and Kochetov, G.A. (2013) Is transketolase-like protein, TKTL1, transketolase? *Biochim. Biophys. Acta*, **1832**, 387–390, doi: 10.1016/j.bbadis.2012.12.004.
- Bunik, V. (2017) *Vitamin-dependent multienzyme complexes of 2-oxo acid dehydrogenases: structure, function, regulation and medical implications*, Nova Science Publishers.
- Bunik, V.I., Tylicki, A., and Lukashev, N.V. (2013) Thiamin diphosphate-dependent enzymes: from enzymology to metabolic regulation, drug design and disease models, *FEBS J.*, **280**, 6412–6442, doi: 10.1111/febs.12512.
- Bunik, V.I., Denton, T.T., Xu, H., Thompson, C.M., Cooper, A.J., and Gibson, G.E. (2005) Phosphonate analogues of  $\alpha$ -ketoglutarate inhibit the activity of the  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex isolated from brain and in cultured cells, *Biochemistry*, **44**, 10552–10561, doi: 10.1021/bi0503100.
- Liu, D., Ke, Z., and Luo, J. (2017) Thiamine deficiency and neurodegeneration: the interplay among oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and autophagy, *Mol. Neurobiol.*, **54**, 5440–5448, doi: 10.1007/s12035-016-0079-9.
- Bunik, V.I., and Aleshin, V.A. (2017) Analysis of the protein binding sites for thiamin and its derivatives to elucidate the molecular mechanisms of the noncoenzyme action of thiamin (vitamin B1), *Studies in Natural Products Chemistry*, **53**, 375–429, doi: 10.1016/b978-0-444-63930-1.00011-9.
- Bunik, V.I. (2014) Benefits of thiamin (vitamin B1) administration in neurodegenerative diseases may be due to both the coenzyme and non-coenzyme roles of thiamin, *J. Alzheimer's Dis. Parkinsonism*, **4**, 173, doi: 10.4172/2161-0460.1000173.
- Gibson, G.E., Blass, J.P., Beal, M.F., and Bunik, V. (2005) The  $\alpha$ -ketoglutarate–dehydrogenase complex: a mediator between mitochondria and oxidative stress in neurodegeneration, *Mol. Neurobiol.*, **31**, 43–63, doi: 10.1385/MN:31:1-3:043.
- Costantini, A., Giorgi, R., D'Agostino, S., and Pala, M.I. (2013) High-dose thiamine improves the symptoms of Friedreich's ataxia, *BMJ Case Rep.*, **2013**, doi: 10.1136/bcr-2013-009424.
- Costantini, A., and Fancellu, R. (2016) An open-label pilot study with high-dose thiamine in Parkinson's disease, *Neural Regen Res.*, **11**, 406–407, doi: 10.4103/1673-5374.179047.
- Snodgrass, S.R. (1992) Vitamin neurotoxicity, *Mol. Neurobiol.*, **6**, 41–73, doi: 10.1007/bf02935566.
- Lonsdale, D. (2006) A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives, *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, **3**, 49–59, doi: 10.1093/ecam/nek009.
- Pan, X., Gong, N., Zhao, J., Yu, Z., Gu, F., Chen, J., Sun, X., Zhao, L., Yu, M., Xu, Z., Dong, W., Qin, Y., Fei, G., Zhong, C., and Xu, T.L. (2010) Powerful beneficial effects of benfotiamine on cognitive impairment and  $\beta$ -amyloid deposition in amyloid precursor protein/presenilin-1 transgenic mice, *Brain*, **133**, 1342–1351, doi: 10.1093/brain/awq069.
- Bettendorff, L., and Wins, P. (1999) Thiamine derivatives in excitable tissues: metabolism, deficiency and neurodegenerative diseases, *Rec. Res. Devel. Neurochem.*, **2**, 37–62.
- Gangolf, M., Czerniecki, J., Radermecker, M., Detry, O., Nisolle, M., Jouan, C., Martin, D., Chantraine, F., Lakaye, B., Wins, P., Grisar, T., and Bettendorff, L. (2010) Thiamine status in humans and content of phosphorylated thiamine derivatives in biopsies and cultured cells, *PLoS One*, **5**, e13616, doi: 10.1371/journal.pone.0013616.
- Frederich, M., Delvaux, D., Gigliobianco, T., Gangolf, M., Dive, G., Mazzucchelli, G., Elias, B., De Pauw, E.,



- Angenot, L., Wins, P., and Bettendorff, L. (2009) Thiaminylated adenine nucleotides. Chemical synthesis, structural characterization and natural occurrence, *FEBS J.*, **276**, 3256–3268, doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07040.x.
21. Bocobza, S.E., Malitsky, S., Araujo, W.L., Nunes-Nesi, A., Meir, S., Shapira, M., Fernie, A.R., and Aharoni, A. (2013) Orchestration of thiamin biosynthesis and central metabolism by combined action of the thiamin pyrophosphate riboswitch and the circadian clock in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, **25**, 288–307, doi: 10.1105/tpc.112.106385.
22. Kim, S., Rhee, J.K., Yoo, H.J., Lee, H.J., Lee, E.J., Lee, J.W., Yu, J.H., Son, B.H., Gong, G., Kim, S.B., Singh, S.R., Ahn, S.H., and Chang, S. (2015) Bioinformatic and metabolomic analysis reveals miR-155 regulates thiamine level in breast cancer, *Cancer Lett.*, **357**, 488–497, doi: 10.1016/j.canlet.2014.11.058.
23. McLure, K.G., Takagi, M., and Kastan, M.B. (2004) NAD<sup>+</sup> modulates p53 DNA binding specificity and function, *Mol. Cell Biol.*, **24**, 9958–9967, doi: 10.1128/MCB.24.22.9958-9967.2004.
24. Lo, P.K., Chen, J.Y., Tang, P.P., Lin, J., Lin, C.H., Su, L.T., Wu, C.H., Chen, T.L., Yang, Y., and Wang, F.F. (2001) Identification of a mouse thiamine transporter gene as a direct transcriptional target for p53, *J. Biol. Chem.*, **276**, 37186–37193, doi: 10.1074/jbc.M104701200.
25. Cooper, J.R., Itokawa, Y., and Pincus, J.H. (1969) Thiamine triphosphate deficiency in subacute necrotizing encephalomyelopathy, *Science*, **164**, 74–75, doi: 10.1126/science.164.3875.74.
26. Pincus, J.H., Solitare, G.B., and Cooper, J.R. (1976) Thiamine triphosphate levels and histopathology. Correlation in Leigh disease, *Arch. Neurol.*, **33**, 759–763, doi: 10.1001/archneur.1976.00500110027005.
27. Gigliobianco, T., Lakaye, B., Makarchikov, A.F., Wins, P., and Bettendorff, L. (2008) Adenylate kinase-independent thiamine triphosphate accumulation under severe energy stress in *Escherichia coli*, *BMC Microbiol.*, **8**, 16, doi: 10.1186/1471-2180-8-16.
28. Nghiem, H.O., Bettendorff, L., and Changeux, J.P. (2000) Specific phosphorylation of Torpedo 43K rapsyn by endogenous kinase(s) with thiamine triphosphate as the phosphate donor, *FASEB J.*, **14**, 543–554, doi: 10.1096/fasebj.14.3.543.
29. Von Muralt, A. (1958) The role of thiamine (vitamin B1) in nerve excitation, *Exp. Cell Res.*, **14**, 72–79.
30. Minz, B. (1938) Sur la liberation de la vitamine B1 par le trone isole de nerf pneumogastrique soumis a l'excitation electrique, *C. R. Soc. Biol.*, **127**, 1251–1253.
31. Itokawa, Y., and Cooper, J.R. (1970) Ion movements and thiamine. II. The release of the vitamin from membrane fragments, *Biochim. Biophys. Acta*, **196**, 274–284, doi: 10.1016/0005-2736(70)90015-5.
32. Tanaka, T., Yamamoto, D., Sato, T., Tanaka, S., Usui, K., Manabe, M., Aoki, Y., Iwashima, Y., Saito, Y., Mino, Y., and Deguchi, H. (2011) Adenosine thiamine triphosphate (AThTP) inhibits poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) activity, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **57**, 192–196, doi: 10.3177/jnsv.57.192.
33. Mkrtchyan, G., Aleshin, V., Parkhomenko, Y., Kaehne, T., Di Salvo, M.L., Parroni, A., Contestabile, R., Vovk, A., Bettendorff, L., and Bunik, V. (2015) Molecular mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin in brain: biochemical, structural and pathway analysis, *Sci. Rep.*, **5**, 12583, doi: 10.1038/srep12583.
34. Rindi, G., Patrini, C., Nauti, A., Bellazzi, R., and Magni, P. (2003) Three thiamine analogues differently alter thiamine transport and metabolism in nervous tissue: an *in vivo* kinetic study using rats, *Metab. Brain Dis.*, **18**, 245–263, doi: 10.1023/B:MEBR.0000020187.98238.58.
35. Matsuda, T., Tonomura, H., Baba, A., and Iwata, H. (1989) Tissue difference in cellular localization of thiamine phosphate esters, *Comp. Biochem. Physiol. B*, **94**, 405–409, doi: 10.1016/0305-0491(89)90364-7.
36. Bettendorff, L., Wins, P., and Lesourd, M. (1994) Subcellular localization and compartmentation of thiamine derivatives in rat brain, *Biochim. Biophys. Acta*, **1222**, 1–6, doi: 10.1016/0167-4889(94)90018-3.
37. Gangolf, M., Wins, P., Thiry, M., El Moulaj, B., and Bettendorff, L. (2010) Thiamine triphosphate synthesis in rat brain occurs in mitochondria and is coupled to the respiratory chain, *J. Biol. Chem.*, **285**, 583–594, doi: 10.1074/jbc.M109.054379.
38. Mayr, J.A., Freisinger, P., Schlachter, K., Rolinski, B., Zimmermann, F.A., Scheffner, T., Haack, T.B., Koch, J., Ahting, U., Prokisch, H., and Sperl, W. (2011) Thiamine pyrophosphokinase deficiency in encephalopathic children with defects in the pyruvate oxidation pathway, *Am. J. Hum. Genet.*, **89**, 806–812, doi: 10.1016/j.ajhg.2011.11.007.
39. Banka, S., de Goede, C., Yue, W.W., Morris, A.A., von Bremen, B., Chandler, K.E., Feichtinger, R.G., Hart, C., Khan, N., Lunzer, V., Matakovic, L., Marquardt, T., Makowski, C., Prokisch, H., Debus, O., Nosaka, K., Sonwalkar, H., Zimmermann, F.A., Sperl, W., and Mayr, J.A. (2014) Expanding the clinical and molecular spectrum of thiamine pyrophosphokinase deficiency: a treatable neurological disorder caused by TPK1 mutations, *Mol. Genet. Metab.*, **113**, 301–306, doi: 10.1016/j.ymgme.2014.09.010.
40. Sano, S., Matsuda, Y., Miyamoto, S., and Nakagawa, H. (1984) Thiamine pyrophosphatase and nucleoside diphosphatase in rat brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **118**, 292–298, doi: 10.1016/0006-291X(84)91099-4.
41. Zebisch, M., Schafer, P., Lauble, P., and Strater, N. (2013) New crystal forms of NTPDase1 from the bacterium *Legionella pneumophila*, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **69**, 257–262, doi: 10.1107/S1744309113001504.
42. Rindi, G., Ricci, V., Gastaldi, G., and Patrini, C. (1995) Intestinal alkaline phosphatase can transphosphorylate thiamin to thiamin monophosphate during intestinal transport in the rat, *Arch. Physiol. Biochem.*, **103**, 33–38, doi: 10.3109/13813459509007560.
43. Zylka, M.J., Sowa, N.A., Taylor-Blake, B., Twomey, M.A., Herrala, A., Voikar, V., and Vihko, P. (2008) Prostatic acid phosphatase is an ectonucleotidase and suppresses pain by generating adenosine, *Neuron*, **60**, 111–122, doi: 10.1016/j.neuron.2008.08.024.
44. Hurt, J.K., Coleman, J.L., Fitzpatrick, B.J., Taylor-Blake, B., Bridges, A.S., Vihko, P., and Zylka, M.J. (2012) Prostatic acid phosphatase is required for the antinociceptive effects of thiamine and benfotiamine, *PLoS One*, **7**, e48562, doi: 10.1371/journal.pone.0048562.
45. Eckert, T., and Moebus, W. (1964) On the ATP thiaminediphosphate phosphotransferase activity in nerve tissue. A contribution on the mechanism of nerve impulse conduction, *Hoppe Seylers Z Physiol. Chem.*, **338**, 286–288.
46. Nishino, K., Itokawa, Y., Nishino, N., Piros, K., and Cooper, J.R. (1983) Enzyme system involved in the synthesis of thiamin triphosphate. I. Purification and characterization of protein-bound thiamin diphosphate: ATP phosphoryltransferase, *J. Biol. Chem.*, **258**, 11871–11878.
47. Shioda, T., Yasuda, S., Yamada, K., Yamada, M., Nakazawa, A., and Kawasaki, T. (1993) Thiamin-triphosphate-synthesizing activity of mutant cytosolic adenylate kinases: significance of Arg-128 for substrate specificity, *Biochim. Biophys. Acta*, **1161**, 230–234, doi: 10.1016/0167-4838(93)90218-G.

48. Makarchikov, A.F., Wins, P., Janssen, E., Wieringa, B., Grisar, T., and Bettendorff, L. (2002) Adenylate kinase 1 knockout mice have normal thiamine triphosphate levels, *Biochim. Biophys. Acta*, **1592**, 117–121, doi: 10.1016/S0167-4889(02)00277-X.
49. Shikata, H., Koyama, S., Egi, Y., Yamada, K., and Kawasaki, T. (1989) Cytosolic adenylate kinase catalyzes the synthesis of thiamin triphosphate from thiamin diphosphate, *Biochem. Int.*, **18**, 933–941.
50. Bettendorff, L., Lakaye, B., Kohn, G., and Wins, P. (2014) Thiamine triphosphate: a ubiquitous molecule in search of a physiological role, *Metab. Brain Dis.*, **29**, 1069–1082, doi: 10.1007/s11011-014-9509-4.
51. Gigliobianco, T., Gangolf, M., Lakaye, B., Pirson, B., von Ballmoos, C., Wins, P., and Bettendorff, L. (2013) An alternative role of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase in *Escherichia coli*: synthesis of thiamine triphosphate, *Sci. Rep.*, **3**, 1071, doi: 10.1038/srep01071.
52. Makarchikov, A.F., and Chernikevich, I.P. (1992) Purification and characterization of thiamine triphosphatase from bovine brain, *Biochim. Biophys. Acta*, **1117**, 326–332, doi: 10.1016/0304-4165(92)90032-P.
53. Bettendorff, L., Michel-Cahay, C., Grandfils, C., De Rycker, C., and Schoffeniels, E. (1987) Thiamine triphosphate and membrane-associated thiamine phosphatases in the electric organ of *Electrophorus electricus*, *J. Neurochem.*, **49**, 495–502, doi: 10.1111/j.1471-4159.1987.tb02891.x.
54. Suryo Rahmanto, Y., Dunn, L.L., and Richardson, D.R. (2007) Identification of distinct changes in gene expression after modulation of melanoma tumor antigen p97 (melanotransferrin) in multiple models *in vitro* and *in vivo*, *Carcinogenesis*, **28**, 2172–2183, doi: 10.1093/carcin/bgm096.
55. Murata, K. (1982) Actions of two types of thiaminase on thiamin and its analogues, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **378**, 146–156, doi: 10.1111/j.1749-6632.1982.tb31193.x.
56. Jenkins, A.H., Schyns, G., Potot, S., Sun, G., and Begley, T.P. (2007) A new thiamin salvage pathway, *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 492–497, doi: 10.1038/nchembio.2007.13.
57. Петров С.А. (1992) Метаболизм тиамина в органах и тканях мыши *in vivo* и *in vitro*, *Физиологический журнал*, **38**, 79–75.
58. Matsuo, T., and Suzuoki, Z. (1969) The occurrence of 4-methylthiazole-5-acetic acid as a thiamine metabolite in rabbit, dog, man and rat, *J. Biochem.*, **65**, 953–960.
59. Nishimune, T., Watanabe, Y., Okazaki, H., and Akai, H. (2000) Thiamin is decomposed due to *Anophe* spp. entomophagy in seasonal ataxia patients in Nigeria, *J. Nutr.*, **130**, 1625–1628, doi: 10.1093/jn/130.6.1625.
60. Bos, M., and Kozik, A. (2000) Some molecular and enzymatic properties of a homogeneous preparation of thiaminase I purified from carp liver, *J. Protein Chem.*, **19**, 75–84, doi: 10.1023/A:1007043530616.
61. Vimokessant, S.L., Hilker, D.M., Nakornchai, S., Rungruangsak, K., and Dhanamitta, S. (1975) Effects of betel nut and fermented fish on the thiamin status of north-eastern Thais, *Am. J. Clin. Nutr.*, **28**, 1458–1463, doi: 10.1093/ajcn/28.12.1458.
62. Law, R.H., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A.M., Silverman, G.A., Wong, W., Rosado, C.J., Langendorf, C.G., Pike, R.N., Bird, P.I., and Whisstock, J.C. (2006) An overview of the serpin superfamily, *Genome Biol.*, **7**, 216, doi: 10.1186/gb-2006-7-5-216.
63. Huertas-Gonzalez, N., Hernando-Requejo, V., Luciano-Garcia, Z., and Cervera-Rodilla, J.L. (2015) Wernicke's encephalopathy, wet beriberi, and polyneuropathy in a patient with folate and thiamine deficiency related to gastric phytobezoar, *Case Rep. Neurol. Med.*, **2015**, 624807, doi: 10.1155/2015/624807.
64. Dutta, B., Huang, W., Molero, M., Kekuda, R., Leibach, F.H., Devoe, L.D., Ganapathy, V., and Prasad, P.D. (1999) Cloning of the human thiamine transporter, a member of the folate transporter family, *J. Biol. Chem.*, **274**, 31925–31929, doi: 10.1074/jbc.274.45.31925.
65. Said, H.M., Balamurugan, K., Subramanian, V.S., and Marchant, J.S. (2004) Expression and functional contribution of hTHTR-2 in thiamin absorption in human intestine, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **286**, G491–G498, doi: 10.1152/ajpgi.00361.2003.
66. Akin, L., Kurtoglu, S., Kendirci, M., Akin, M.A., and Karakukcu, M. (2011) Does early treatment prevent deafness in thiamine-responsive megaloblastic anaemia syndrome? *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.*, **3**, 36–39, doi: 10.4274/jcrpe.v3i1.08.
67. Mendoza, R., Miller, A.D., and Overbaugh, J. (2013) Disruption of thiamine uptake and growth of cells by feline leukemia virus subgroup A, *J. Virol.*, **87**, 2412–2419, doi: 10.1128/JVI.03203-12.
68. Ortigoza-Escobar, J.D., Molero-Luis, M., Arias, A., Oyarzabal, A., Darin, N., Serrano, M., Garcia-Cazorla, A., Tondo, M., Hernandez, M., Garcia-Villoria, J., Casado, M., Gort, L., Mayr, J.A., Rodriguez-Pombo, P., Ribes, A., Artuch, R., and Perez-Duenas, B. (2016) Free-thiamine is a potential biomarker of thiamine transporter-2 deficiency: a treatable cause of Leigh syndrome, *Brain*, **139**, 31–38, doi: 10.1093/brain/awv342.
69. Alfadhel, M. (2017) Early infantile leigh-like *SLC19A3* gene defects have a poor prognosis: report and review, *J. Cent. Nerv. Syst. Dis.*, **9**, 1179573517737521, doi: 10.1177/1179573517737521.
70. Zhang, K., Huentelman, M.J., Rao, F., Sun, E.I., Corneveaux, J.J., Schork, A.J., Wei, Z., Waalen, J., Miramontes-Gonzalez, J.P., Hightower, C.M., Maihofer, A.X., Mahata, M., Pastinen, T., Ehret, G.B., International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies, Schork, N.J., Eskin, E., Nievergelt, C.M., Sailer, M.H., Jr., and O'Connor, D.T. (2014) Genetic implication of a novel thiamine transporter in human hypertension, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **63**, 1542–1555, doi: 10.1016/j.jacc.2014.01.007.
71. Subramanian, V.S., Nabokina, S.M., Lin-Moshier, Y., Marchant, J.S., and Said, H.M. (2013) Mitochondrial uptake of thiamin pyrophosphate: physiological and cell biological aspects, *PLoS One*, **8**, e73503, doi: 10.1371/journal.pone.0073503.
72. Fraccascia, P., Sniekers, M., Casteels, M., and van Veldhoven, P.P. (2007) Presence of thiamine pyrophosphate in mammalian peroxisomes, *BMC Biochem.*, **8**, 10, doi: 10.1186/1471-2091-8-10.
73. Nabokina, S.M., Inoue, K., Subramanian, V.S., Valle, J.E., Yuasa, H., and Said, H.M. (2014) Molecular identification and functional characterization of the human colonic thiamine pyrophosphate transporter, *J. Biol. Chem.*, **289**, 4405–4416, doi: 10.1074/jbc.M113.528257.
74. Lemos, C., Faria, A., Meireles, M., Martel, F., Monteiro, R., and Calhau, C. (2012) Thiamine is a substrate of organic cation transporters in Caco-2 cells, *Eur. J. Pharmacol.*, **682**, 37–42, doi: 10.1016/j.ejphar.2012.02.028.
75. Chen, L., Shu, Y., Liang, X., Chen, E.C., Yee, S.W., Zur, A.A., Li, S., Xu, L., Keshari, K.R., Lin, M.J., Chien, H.C., Zhang, Y., Morrissey, K.M., Liu, J., Ostrem, J., Younger, N.S., Kurhanewicz, J., Shokat, K.M., Ashrafi, K., and Giacomini, K.M. (2014) OCT1 is a high-capacity thiamine transporter that regulates hepatic steatosis and is a target of metformin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 9983–9988, doi: 10.1073/pnas.1314939111.
76. Kato, K., Mori, H., Kito, T., Yokochi, M., Ito, S., Inoue, K., Yonezawa, A., Katsura, T., Kumagai, Y., Yuasa, H.,

- Moriyama, Y., Inui, K., Kusuhara, H., and Sugiyama, Y. (2014) Investigation of endogenous compounds for assessing the drug interactions in the urinary excretion involving multidrug and toxin extrusion proteins, *Pharm. Res.*, **31**, 136–147, doi: 10.1007/s11095-013-1144-y.
77. Zhao, R., Gao, F., Wang, Y., Diaz, G.A., Gelb, B.D., and Goldman, I.D. (2001) Impact of the reduced folate carrier on the accumulation of active thiamin metabolites in murine leukemia cells, *J. Biol. Chem.*, **276**, 1114–1118, doi: 10.1074/jbc.M007919200.
78. Tanihara, Y., Masuda, S., Sato, T., Katsura, T., Ogawa, O., and Inui, K. (2007) Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H<sup>+</sup>-organic cation antiporters, *Biochem. Pharmacol.*, **74**, 359–371, doi: 10.1016/j.bcp.2007.04.010.
79. Liu, S., Huang, H., Lu, X., Golinski, M., Comesse, S., Watt, D., Grossman, R.B., and Moscow, J.A. (2003) Down-regulation of thiamine transporter *THTR2* gene expression in breast cancer and its association with resistance to apoptosis, *Mol. Cancer Res.*, **1**, 665–673.
80. Liu, X., Lam, E.K., Wang, X., Zhang, J., Cheng, Y.Y., Lam, Y.W., Ng, E.K., Yu, J., Chan, F.K., Jin, H., and Sung, J.J. (2009) Promoter hypermethylation mediates downregulation of thiamine receptor SLC19A3 in gastric cancer, *Tumour Biol.*, **30**, 242–248, doi: 10.1159/000243767.
81. Ikehata, M., Ueda, K., and Iwakawa, S. (2012) Different involvement of DNA methylation and histone deacetylation in the expression of solute-carrier transporters in 4 colon cancer cell lines, *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 301–307, doi: 10.1248/bpb.35.301.
82. Zastre, J.A., Sweet, R.L., Hanberry, B.S., and Ye, S. (2013) Linking vitamin B1 with cancer cell metabolism, *Cancer Metab.*, **1**, 16, doi: 10.1186/2049-3002-1-16.
83. Mkrtchyan, G., Graf, A., Bettendorff, L., and Bunik, V. (2016) Cellular thiamine status is coupled to function of mitochondrial 2-oxoglutarate dehydrogenase, *Neurochem. Int.*, **101**, 66–75, doi: 10.1016/j.neuint.2016.10.009.
84. Daily, A., Liu, S., Bae, Y., Bhatnagar, S., and Moscow, J.A. (2011) Linear chain PEGylated recombinant *Bacillus thiaminolyticus* thiaminase I enzyme has growth inhibitory activity against lymphoid leukemia cell lines, *Mol. Cancer Ther.*, **10**, 1563–1570, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0003.
85. Liu, S., Stromberg, A., Tai, H.H., and Moscow, J.A. (2004) Thiamine transporter gene expression and exogenous thiamine modulate the expression of genes involved in drug and prostaglandin metabolism in breast cancer cells, *Mol. Cancer Res.*, **2**, 477–487.
86. Liang, X., Chien, H.C., Yee, S.W., Giacomini, M.M., Chen, E.C., Piao, M., Hao, J., Twelves, J., Lepist, E.I., Ray, A.S., and Giacomini, K.M. (2015) Metformin is a substrate and inhibitor of the human thiamine transporter, *THTR-2* (SLC19A3), *Mol. Pharm.*, **12**, 4301–4310, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00501.
87. Kimura, N., Masuda, S., Tanihara, Y., Ueo, H., Okuda, M., Katsura, T., and Inui, K. (2005) Metformin is a superior substrate for renal organic cation transporter OCT2 rather than hepatic OCT1, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **20**, 379–386, doi: 10.2133/dmpk.20.379.
88. Liang, X., Yee, S.W., Chien, H.C., Chen, E.C., Luo, Q., Zou, L., Piao, M., Mifune, A., Chen, L., Calvert, M.E., King, S., Norheim, F., Abad, J., Krauss, R.M., and Giacomini, K.M. (2018) Organic cation transporter 1 (OCT1) modulates multiple cardiometabolic traits through effects on hepatic thiamine content, *PLoS Biol.*, **16**, e2002907, doi: 10.1371/journal.pbio.2002907.
89. Umehara, K.I., Iwatsubo, T., Noguchi, K., and Kamimura, H. (2007) Comparison of the kinetic characteristics of inhibitory effects exerted by biguanides and H<sup>2</sup>-blockers on human and rat organic cation transporter-mediated transport: insight into the development of drug candidates, *Xenobiotica*, **37**, 618–634, doi: 10.1080/00498250701397705.
90. Osiezagha, K., Ali, S., Freeman, C., Barker, N.C., Jabeen, S., Maitra, S., Olagbemi, Y., Richie, W., and Bailey, R.K. (2013) Thiamine deficiency and delirium, *Innov. Clin. Neurosci.*, **10**, 26–32.
91. Miralles-Linares, F., Puerta-Fernandez, S., Bernal-Lopez, M.R., Tinahones, F.J., Andrade, R.J., and Gomez-Huelgas, R. (2012) Metformin-induced hepatotoxicity, *Diabetes Care*, **35**, e21, doi: 10.2337/dc11-2306.
92. Kalantar-Zadeh, K., and Kovesdy, C.P. (2016) Should restrictions be relaxed for metformin use in chronic kidney disease? No, we should never again compromise safety! *Diabetes Care*, **39**, 1281–1286, doi: 10.2337/dc15-2327.
93. Toyama, K., Yonezawa, A., Masuda, S., Osawa, R., Hosokawa, M., Fujimoto, S., Inagaki, N., Inui, K., and Katsura, T. (2012) Loss of multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1) is associated with metformin-induced lactic acidosis, *Br. J. Pharmacol.*, **166**, 1183–1191, doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01853.x.
94. Vecchio, S., and Protti, A. (2011) Metformin-induced lactic acidosis: no one left behind, *Crit. Care*, **15**, 107, doi: 10.1186/cc9404.
95. Amrein, K., Ribitsch, W., Otto, R., Worm, H.C., and Stauber, R.E. (2011) Severe lactic acidosis reversed by thiamine within 24 hours, *Crit. Care*, **15**, 457, doi: 10.1186/cc10495.
96. Godo, S., Yoshida, Y., Fujita, M., Kudo, D., Nomura, R., Shimokawa, H., and Kushimoto, S. (2017) The dramatic recovery of a patient with biguanide-associated severe lactic acidosis following thiamine supplementation, *Intern. Med.*, **56**, 455–459, doi: 10.2169/internalmedicine.56.7754.
97. McGarvey, C., Franconi, C., Prentice, D., and Bynevelt, M. (2018) Metformin-induced encephalopathy: the role of thiamine, *Intern. Med. J.*, **48**, 194–197, doi: 10.1111/imj.13693.
98. Costantini, A. (2018) High-dose thiamine and essential tremor, *BMJ Case Rep.*, **2018**, doi: 10.1136/bcr-2017-223945.
99. Page, G.L., Laight, D., and Cummings, M.H. (2011) Thiamine deficiency in diabetes mellitus and the impact of thiamine replacement on glucose metabolism and vascular disease, *Int. J. Clin. Pract.*, **65**, 684–690, doi: 10.1111/j.1742-1241.2011.02680.x.
100. Moraes, J.O., Rodrigues, S.D.C., Pereira, L.M., Medeiros, R.d.C.N., de Cordova, C.A.S., and de Cordova, F.M. (2018) Amprolium exposure alters mice behavior and metabolism *in vivo*, *Animal Model Exp. Med.*, **1**, 272–281, doi: 10.1002/ame2.12040.
101. Singh, V., Peng, C.S., Li, D., Mitra, K., Silvestre, K.J., Tokmakoff, A., and Essigmann, J.M. (2014) Direct observation of multiple tautomers of oxythiamine and their recognition by the thiamine pyrophosphate riboswitch, *ACS Chem. Biol.*, **9**, 227–236, doi: 10.1021/cb400581f.
102. Hirsch, J.A., and Parrott, J. (2012) New considerations on the neuromodulatory role of thiamine, *Pharmacology*, **89**, 111–116, doi: 10.1159/000336339.
103. Aleshin, V.A., Artiukhov, A.V., Oppermann, H., Kazantsev, A.V., Lukashev, N.V., and Bunik, V.I. (2015) Mitochondrial impairment may increase cellular NAD(P)H: resazurin oxidoreductase activity, perturbing the NAD(P)H-based viability assays, *Cells*, **4**, 427–451, doi: 10.3390/cells4030427.
104. Fukui, S., Ohishi, N., Kishimoto, Takamizawa, A., and Hamazima, Y. (1965) Formation of «thiaminosuccinic acid» as an intermediate in the transformation of oxythi-



- amine to thiamine by a thiamineless mutant of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **240**, 1315–1321.
105. Goyer, A., Hasnain, G., Frelin, O., Ralat, M.A., Gregory, J.F., 3<sup>rd</sup>, and Hanson, A.D. (2013) A cross-kingdom Nudix enzyme that pre-emptly damage in thiamin metabolism, *Biochem. J.*, **454**, 533–542, doi: 10.1042/BJ20130516.
  106. Zhang, F., Masania, J., Anwar, A., Xue, M., Zehnder, D., Kanji, H., Rabbani, N., and Thornalley, P.J. (2016) The uremic toxin oxythiamine causes functional thiamine deficiency in end-stage renal disease by inhibiting transketolase activity, *Kidney Int.*, **90**, 396–403, doi: 10.1016/j.kint.2016.03.010.
  107. Linster, C.L., van Schaftingen, E., and Hanson, A.D. (2013) Metabolite damage and its repair or pre-emption, *Nat. Chem. Biol.*, **9**, 72–80, doi: 10.1038/nchembio.1141.
  108. Nemeria, N.S., Shome, B., DeColli, A.A., Heflin, K., Begley, T.P., Meyers, C.F., and Jordan, F. (2016) Competence of thiamin diphosphate-dependent enzymes with 2'-methoxythiamin diphosphate derived from bacimethrin, a naturally occurring thiamin anti-vitamin, *Biochemistry*, **55**, 1135–1148, doi: 10.1021/acs.biochem.5b01300.
  109. Agyei-Owusu, K., and Leeper, F.J. (2009) Thiamin diphosphate in biological chemistry: analogues of thiamin diphosphate in studies of enzymes and riboswitches, *FEBS J.*, **276**, 2905–2916, doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07018.x.
  110. Iwadata, D., Sato, K., Kanzaki, M., Komiyama, C., Watanabe, C., Eguchi, T., and Uesaka, Y. (2017) Thiamine deficiency in metronidazole-induced encephalopathy: a metabolic correlation? *J. Neurol. Sci.*, **379**, 324–326, doi: 10.1016/j.jns.2017.06.042.
  111. Ding, B.C., Whetstone, J.R., Witt, T.L., Schuetz, J.D., and Matherly, L.H. (2001) Repression of human reduced folate carrier gene expression by wild type p53, *J. Biol. Chem.*, **276**, 8713–8719, doi: 10.1074/jbc.M005248200.
  112. Yang, Z., Ge, J., Yin, W., Shen, H., Liu, H., and Guo, Y. (2004) The expression of p53, MDM2 and Ref1 gene in cultured retina neurons of SD rats treated with vitamin B1 and/or elevated pressure, *Yan Ke Xue Bao*, **20**, 259–263.
  113. Chorny, S., Parkhomenko, Y., and Chorna, N. (2017) Thiamine antagonists trigger p53-dependent apoptosis in differentiated SH-SY5Y cells, *Sci. Rep.*, **7**, 10632, doi: 10.1038/s41598-017-10878-x.
  114. Pagadala, N.S., Bjorndahl, T.C., Blinov, N., Kovalenko, A., and Wishart, D.S. (2013) Molecular docking of thiamine reveals similarity in binding properties between the prion protein and other thiamine-binding proteins, *J. Mol. Model.*, **19**, 5225–5235, doi: 10.1007/s00894-013-1979-5.
  115. Perez-Pineiro, R., Bjorndahl, T.C., Berjanskii, M.V., Hau, D., Li, L., Huang, A., Lee, R., Gibbs, E., Ladner, C., Dong, Y.W., Abera, A., Cashman, N.R., and Wishart, D.S. (2011) The prion protein binds thiamine, *FEBS J.*, **278**, 4002–4014, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08304.x.
  116. Pulkkinen, V., Manson, M.L., Safholm, J., Adner, M., and Dahlen, S.E. (2012) The bitter taste receptor (TAS2R) agonists denatonium and chloroquine display distinct patterns of relaxation of the guinea pig trachea, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **303**, L956–L966, doi: 10.1152/ajplung.00205.2012.
  117. Lossow, K., Hubner, S., Roudnitzky, N., Slack, J.P., Pollastro, F., Behrens, M., and Meyerhof, W. (2016) Comprehensive analysis of mouse bitter taste receptors reveals different molecular receptive ranges for orthologous receptors in mice and humans, *J. Biol. Chem.*, **291**, 15358–15377, doi: 10.1074/jbc.M116.718544.
  118. Lucas, J.I., and Marin, I. (2007) A new evolutionary paradigm for the Parkinson disease gene *DJ-1*, *Mol. Biol. Evol.*, **24**, 551–561, doi: 10.1093/molbev/msl186.
  119. Мкртчян Г. (2017) *Молекулярные механизмы действия тиамина (витамина В1) в нервной ткани*, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва.
  120. Tsepkova, P.M., Artiukhov, A.V., Boyko, A.I., Aleshin, V.A., Mkrtychyan, G.V., Zvyagintseva, M.A., Ryabov, S.I., Ksenofontov, A.L., Baratova, L.A., Graf, A.V., and Bunik, V.I. (2017) Thiamine induces long-term changes in amino acid profiles and activities of 2-oxoglutarate and 2-oxoadipate dehydrogenases in rat brain, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 723–736, doi: 10.1134/S0006297917060098.
  121. Петров С.А., Донеско Е.В. (1989) Эффект тиамина и его метаболитов на активность аминотрансфераз аспартата и аланина в организме белых крыс и в крови доноров, *Физиологический журнал*, **35**, 94–96.
  122. Singh, M., Kaur, M., Kukreja, H., Chugh, R., Silakari, O., and Singh, D. (2013) Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: from nerve toxins to neuroprotection, *Eur. J. Med. Chem.*, **70**, 165–188, doi: 10.1016/j.ejmech.2013.09.050.
  123. Lonsdale, D. (2004) Thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide: a little known therapeutic agent, *Med. Sci. Monit.*, **10**, RA199–RA203.
  124. Tapias, V., Jainuddin, S., Ahuja, M., Stack, C., Elipenahli, C., Vignisse, J., Gerges, M., Starkova, N., Xu, H., Starkov, A.A., Bettendorff, L., Hushpalian, D.M., Smirnova, N.A., Gazaryan, I.G., Kaidery, N.A., Wakade, S., Calingasan, N.Y., Thomas, B., Gibson, G.E., Dumont, M., and Beal, M.F. (2018) Benfotiamine treatment activates the Nrf2/ARE pathway and is neuroprotective in a transgenic mouse model of tauopathy, *Hum. Mol. Genet.*, **27**, 2874–2892, doi: 10.1093/hmg/ddy201.
  125. Gibson, G.E., Hirsch, J.A., Fonzeetti, P., Jordan, B.D., Cirio, R.T., and Elder, J. (2016) Vitamin B1 (thiamine) and dementia, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1367**, 21–30, doi: 10.1111/nyas.13031.
  126. Volvert, M.L., Seyen, S., Piette, M., Evrard, B., Gangolf, M., Plumier, J.C., and Bettendorff, L. (2008) Benfotiamine, a synthetic S-acyl thiamine derivative, has different mechanisms of action and a different pharmacological profile than lipid-soluble thiamine disulfide derivatives, *BMC Pharmacol.*, **8**, 10, doi: 10.1186/1471-2210-8-10.
  127. Vignisse, J., Sambon, M., Gorlova, A., Pavlov, D., Caron, N., Malgrange, B., Shevtsova, E., Svistunov, A., Anthony, D.C., Markova, N., Bazhenova, N., Coumans, B., Lakaye, B., Wins, P., Strekalova, T., and Bettendorff, L. (2017) Thiamine and benfotiamine prevent stress-induced suppression of hippocampal neurogenesis in mice exposed to predation without affecting brain thiamine diphosphate levels, *Mol. Cell Neurosci.*, **82**, 126–136, doi: 10.1016/j.mcn.2017.05.005.
  128. Mouton-Liger, F., Rebillat, A.S., Gourmaud, S., Paquet, C., Leguen, A., Dumurgier, J., Bernadelli, P., Taupin, V., Pradier, L., Rooney, T., and Hugon, J. (2015) PKR down-regulation prevents neurodegeneration and  $\beta$ -amyloid production in a thiamine-deficient model, *Cell Death Dis.*, **6**, e1594, doi: 10.1038/cddis.2014.552.
  129. Sun, X.J., Zhao, L., Zhao, N., Pan, X.L., Fei, G.Q., Jin, L.R., and Zhong, C.J. (2012) Benfotiamine prevents increased  $\beta$ -amyloid production in HEK cells induced by high glucose, *Neurosci. Bull.*, **28**, 561–566, doi: 10.1007/s12264-012-1264-0.
  130. Zhang, X., Hernandez, I., Rei, D., Mair, W., Laha, J.K., Cornwell, M.E., Cuny, G.D., Tsai, L.H., Steen, J.A., and Kosik, K.S. (2013) Diaminotiazoles modify Tau phosphorylation and improve the tauopathy in mouse models, *J. Biol. Chem.*, **288**, 22042–22056, doi: 10.1074/jbc.M112.436402.
  131. Markova, N., Bazhenova, N., Anthony, D.C., Vignisse, J., Svistunov, A., Lesch, K.P., Bettendorff, L., and Strekalova, T. (2017) Thiamine and benfotiamine improve cognition and ameliorate GSK-3 $\beta$ -associated stress-induced behaviours



- in mice, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **75**, 148–156, doi: 10.1016/j.pnpbp.2016.11.001.
132. Gold, M., Hauser, R.A., and Chen, M.F. (1998) Plasma thiamine deficiency associated with Alzheimer's disease but not Parkinson's disease, *Metab. Brain Dis.*, **13**, 43–53, doi: 10.1023/A:1020678912330.
133. Pan, X., Fei, G., Lu, J., Jin, L., Pan, S., Chen, Z., Wang, C., Sang, S., Liu, H., Hu, W., Zhang, H., Wang, H., Wang, Z., Tan, Q., Qin, Y., Zhang, Q., Xie, X., Ji, Y., Cui, D., Gu, X., Xu, J., Yu, Y., and Zhong, C. (2016) Measurement of blood thiamine metabolites for Alzheimer's disease diagnosis, *EBioMedicine*, **3**, 155–162, doi: 10.1016/j.ebiom.2015.11.039.
134. Pan, X., Sang, S., Fei, G., Jin, L., Liu, H., Wang, Z., Wang, H., and Zhong, C. (2017) Enhanced activities of blood thiamine diphosphatase and monophosphatase in Alzheimer's disease, *PLoS One*, **12**, e0167273, doi: 10.1371/journal.pone.0167273.
135. Jimenez-Jimenez, F.J., Molina, J.A., Hernanz, A., Fernandez-Vivancos, E., de Bustos, F., Barcenilla, B., Gomez-Escalonilla, C., Zurdo, M., Berbel, A., and Villanueva, C. (1999) Cerebrospinal fluid levels of thiamine in patients with Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.*, **271**, 33–36, doi: 10.1016/S0304-3940(99)00515-7.
136. Mizuno, Y., Matuda, S., Yoshino, H., Mori, H., Hattori, N., and Ikebe, S. (1994) An immunohistochemical study on  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex in Parkinson's disease, *Ann. Neurol.*, **35**, 204–210, doi: 10.1002/ana.410350212.
137. Haglin, L., Johansson, I., Forsgren, L., and Backman, L. (2017) Intake of vitamin B before onset of Parkinson's disease and atypical parkinsonism and olfactory function at the time of diagnosis, *Eur. J. Clin. Nutr.*, **71**, 97–102, doi: 10.1038/ejcn.2016.181.
138. Boyko, A., Ksenofontov, A., Ryabov, S., Baratova, L., Graf, A., and Bunik, V. (2017) Delayed influence of spinal cord injury on the amino acids of NO<sup>-</sup> metabolism in rat cerebral cortex is attenuated by thiamine, *Front. Med. (Lausanne)*, **4**, 249, doi: 10.3389/fmed.2017.00249.
139. Mkrtychyan, G.V., Ucal, M., Mullebner, A., Dumitrescu, S., Kames, M., Moldzio, R., Molcanyi, M., Schaefer, S., Weidinger, A., Schaefer, U., Hescheler, J., Duvigneau, J.C., Redl, H., Bunik, V.I., and Kozlov, A.V. (2018) Thiamine preserves mitochondrial function in a rat model of traumatic brain injury, preventing inactivation of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1859**, 925–931, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.05.005.

## MECHANISMS OF THE NON-COENZYME ACTION OF THIAMINE: PROTEIN TARGETS AND MEDICAL SIGNIFICANCE

V. A. Aleshin<sup>1,2</sup>, G. V. Mkrtychyan<sup>1</sup>, and V. I. Bunik<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119991 Moscow, Russia

<sup>2</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 199991 Moscow, Russia; E-mail: bunik@belozersky.msu.ru

Received December 27, 2018

Revised April 7, 2019

Accepted April 7, 2019

Thiamine (vitamin B1) is a precursor of a well-known coenzyme of central metabolism, thiamine diphosphate (ThDP). A very high intensity of ThDP-dependent energy production from glucose in brain determines critical significance of thiamine for neuronal functions. However, non-coenzyme mechanisms of thiamine action have been characterized as well. The long-known facilitation of acetylcholinergic neurotransmission upon the co-release of thiamine and acetylcholine into synaptic cleft is currently supported at molecular level by the thiamine-triphosphate (ThTP)-dependent phosphorylation of the acetylcholine-receptor-binding protein rapsin and by the thiamine interaction with receptor TAS2R1, activating synaptic ion currents. Non-coenzyme type of regulatory binding of thiamine compounds is also established for transcriptional regulator p53, poly(ADP-ribose)-polymerase, prion protein PRNP and a number of key metabolic enzymes which do not use ThDP as a coenzyme. The reviewed results indicate that molecular mechanisms of the neurotropic action of thiamine are much more diverse than usually considered. These mechanisms are intimately linked to metabolism of thiamine and its derivatives in animals that is also summarized in the review. Newly acquired significance of this topic is demonstrated by the recently established competition of thiamine and antidiabetic drug metformin for their common transporters. The competition may cause thiamine deficiency underlying known side effects of metformin. Medical implications of basic research on thiamine are highlighted, regarding the role of thiaminases in the thiamine reutilization and biosynthesis of thiamine antagonists; molecular mechanisms of action of natural and synthetic thiamine antagonists; biotransformation of pharmacological forms of thiamine. Given the wide pharmacological application of thiamine and its synthetic forms, the reviewed data are of high importance for medicine and pharmacology, including therapy of neurodegenerative diseases.

**Keywords:** metformin, p53, serpin, thiamine, thiamine transport, thiaminase, vitamin B1