

УДК 577.164.11:612.453.018.2

И.П. ЧЕРНИКЕВИЧ, д-р хим. наук, профессор,
профессор кафедры общей и биоорганической химии¹

Н.Н. КОСТЕНЕВИЧ

старший преподаватель кафедры общей и биоорганической химии¹

¹Гродненский государственный медицинский университет,
г. Гродно, Республика Беларусь

В.В. БАУМ

врач анестезиолог

1134 Военный клинический медицинский центр Вооруженных сил,
г. Гродно, Республика Беларусь

Статья поступила 15 апреля 2024 г.

К ВОПРОСУ О ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА КОФЕРМЕНТНОЙ ФОРМЫ ВИТАМИНА В₁ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ

Гормональной регуляции принадлежит чрезвычайно важная роль как в поддержании гомеостаза, так и в адаптации обменных процессов к изменениям внутренней или внешней среды организма. Большинство проявлений гормональной регуляции связано с функцией ферментов, активность и количество которых изменяется посредством действия гормонов.

В статье представлены результаты исследования возможности гормонального регулирования скорости образования коферментной формы витамина В₁ в клетках головного мозга.

Наличие гормональной составляющей анализировали в ситуациях in vitro и in vivo. In vitro опыты выполнены с использованием гомогенной тиаминокиназы из мозга свиньи. Получены доказательства образования лабильного гормон-ферментного комплекса гидрокортизон-тиаминокиназа. Ассоциация вызвана возникновением водородных и гидрофобных связей и не сопровождается нарушением конформации белка. Молекулярно-кинетические свойства фермента в составе комплекса существенно не изменены, однако увеличивается время полужизни глобулы. Инсулин не связывается с тиаминокиназой и не влияет на скорость катализа. Отсутствие гормональной составляющей в биосинтезе тиаминдифосфата прослеживается и в опытах in vivo. В течение первых часов после введения избытка витамина подопытным животным скорость образования кофермента во всех сравниваемых группах практически одинакова и не определяется исходным уровнем гормонов в ткани. Напротив, процесс дефосфорилирования протекает строго в рамках гормонозависимой динамики, подтверждая постулат о роли некоферментных В₁-реакций в анаэробном производстве энергии.

Ключевые слова: тиаминокиназа, тиаминдифосфат, мозг, гормональная регуляция.

CHERNIKEVICH I.P., Doctor of Chemistry Sc., Professor,
Professor at the Department of General and Bioorganic Chemistry¹

KOSTENEVICH N.N., Senior Lecturer at the Department of General and Bioorganic Chemistry¹
¹Grodno State Medical University, Republic of Belarus

BAUM V.V., Anesthesiologist

1134 Military Clinical Medical Center of the Armed Forces, Grodno, Republic of Belarus

TO THE QUESTION OF THE HORMONAL REGULATION OF BIOSYNTHESIS OF THE COENZYMATIC FORM OF VITAMIN B₁ IN THE BRAIN

Hormonal regulation has an extremely important role in maintaining of homeostasis and in adapting of the metabolic processes to changes in the internal or external environment of the organism. Most manifestations of hormonal regulation are associated with the function of enzymes, the activity and amount of which is changed through the action of hormones.

The article presents the results of a study of the possibility of hormonal regulation of the rate of formation of the co-enzyme form of vitamin B₁ in the brain's cells.

The presence of the hormonal component was analyzed in vitro and in vivo situations. In vitro, experiments were performed using homogeneous thiamine kinase from the pig's brain. Arguments of the formation of a labile hormone-enzyme complex hydrocortisone-thiamine kinase were obtained. The association is caused by the occurrence of the hydrogen and hydrophobic bonds and is not accompanied by a violation of the protein conformation. The molecular kinetic properties of the enzyme are not changed in the complex significantly, but the half-life of a globule increases. An insulin does not bind to thiamine kinase and does not affect the rate of catalysis. The absence of a hormonal component in the biosynthesis of thiamine diphosphate is also observed in the experiments in vivo. Within the first hours after the administration of excess vitamin to test animals, the rate of coenzyme formation in all compared groups is substantially the same and is not determined by the baseline level of hormones in the tissue. On the contrary, the dephosphorylation process proceeds strictly within the framework of hormone-dependent dynamics, confirming the postulate about the role of non-enzymatic B₁ reactions in anaerobic energy production.

Keywords: *thiamine kinase, thiamine diphosphate, a brain, the hormonal regulation.*

Введение. Хорошо известно, что необходимой предпосылкой проявления специфического действия тиамин (витамина В₁) на уровне почти 40 описанных на сегодня В₁-зависимых ферментов (www.brenda-enzymes.org) является состояние гиповитаминоза, т.е. дефицита тиаминдифосфата (ТДФ) как кофермента. Его введение в случае недостаточности через стимуляцию окисления субстратов в пируват- и α-кетоглутаратдегидрогеназных реакциях цикла трикарбоновых кислот будет усиливать генерацию энергии, а через транскетолазу – контролировать синтез рибозо-5-фосфата и восстановительных эквивалентов в пентозофосфатном пути, необходимых для удовлетворения пластических нужд организма, что целесообразно при сахарном диабете, ацидозах иного происхождения, инсулиновом шоке, заболеваниях сердца (недостаточности коронарного кровообращения, инфаркте миокарда), легких формах рассеянного склероза, врожденных патологиях, когда нарушено фосфорилирование витамина или когда резко активированы процессы энергопотребления или пластики [1].

Успехи последних лет в выяснении некоферментных функций тиамин (тиаминмоно- и трифосфатов) в метаболических процессах еще более расширили реальный спектр ис-

пользования В₁ в лечении нарушений, в этиологии которых важная роль отводится стрессорным факторам. К тиамину все чаще прибегают в случае комплексной терапии снятия болевых синдромов, метаболической терапии полинейропатии, синдрома диабетической стопы, патогенетической коррекции эпигенетических механизмов развития дисфункции эндотелия, комплексном лечении радикулопатии. Наноструктурированный тиамин и его производные находят применение при производстве функционально важных продуктов питания – хлеба, мороженого. Причем в силу возрастания агрессивности среды обитания, из-за манифестации экологического, экономического и социального кризисов, рекомендуемые профилактические дозы витамина, способные оказать выраженный терапевтический эффект, как правило, превышают суточную потребность человека (1-2 мг) в несколько раз [2,3].

Сравнительный анализ интенсивности метаболических процессов биосинтеза и деградации фосфорных эфиров тиамин позволяет полагать, что реализация лечебных эффектов повышенных концентраций витамина будет осуществляться путём активации функциональной активности фосфатаз, скорость обрачиваемости которых в каталитическом акте на порядок и более превышает скорость обо-

рачиваемости тиаминкиназ [1,4]. Быстрообращаемые ферменты находятся под сложным регуляторным контролем – витамин изначально действует на конкретный эндокринный орган, гормоны которого посредством активации или ингибирования белков-ферментов обуславливают конечный метаболический эффект. Такое мнение согласуется с данными работы [5], где авторы показали, что из-за высокой каталитической активности гидролитических фосфатаз многократные инъекции тиаминкиназы не приводят ни к сверхпродукции V_1 -зависимых белковых молекул, ни к их быстрому восстановлению до уровня нормы.

Гормональная регуляция характерна не только для быстрообращаемых гидролаз, но и для многочисленных ферментов анаболических процессов, в частности трансфераз (киназ), расположенных зачастую в местах разветвления метаболических путей и контролирующих интенсивность биохимических потоков в клетке [6]. Биосинтез ТДФ катализируется тиаминкиназой, ключевым ферментом обмена витамина, лимитирующим скорость его трансформации до физиологически активных производных, и его регуляция на субклеточном или нервно-гормональном уровнях вполне правомочна. Такие ферменты обеспечивают строгую последовательность каталитических процессов и в этой связи представляют интерес как мишени для воздействия биологических веществ и лекарственных агентов.

Цель настоящего исследования – выяснение возможности гормонального регулирования скорости образования тиаминдифосфата в клетках головного мозга.

Материалы и методы исследований. В работе использовали выделенный нами лиофилизированный препарат гомогенной тиаминкиназы (КФ 2.7.6.2) головного мозга свиньи [4], инсулин («Calbiochem», США) и гидрокортизонацетат («Richter», Венгрия). Остальные реактивы («Реахим», Россия).

Вопросы гормональной регуляции биосинтеза ТДФ проанализированы в ситуациях *in vitro* и *in vivo*. В опытах *in vitro* 12 мг лиофилизированного препарата гомогенной тиаминкиназы растворяли в 0,5 мл 0,02 М трис-НСІ буфера рН 7,4 и инкубировали со 150 мкг гидрокортизонацетата или 200 мкг инсулина в течении 30 мин при 4°C. Разделение

компонентов осуществляли при этой же температуре на колонке с сефадексом G-100 диаметром 1 см и высотой слоя 30 см. Элюцию вели 0,02 М трис-НСІ буфером рН 7,4, со скоростью 0,2 мл в мин, собирая фракции по 2,5 мл. Содержание киназы определяли по методу Брэдфорда, гидрокортизона – спектрофотометрически при 250 нм после предварительного осаждения белка 10%-ной ТХУ.

In vivo исследования выполнены на крысах-самцах массой 200-220 г. Концентрацию ТДФ в мозге интактных, адреналэктомированных или панкреатэктомированных животных и получавших гидрокортизон (1,25 мг/100 г) или инсулин (1 мг/100 г) измеряли в различные промежутки времени после однократной инъекции тиаминкиназы в дозе 20 мг/100 г. Гиперкортицизм создавали моделируя острый стресс подкожным введением 1 мл скипидара за 1 ч до забоя, на фоне предварительного хронического раздражения звуком и светом в течении семи суток, или же 7-дневным парентеральным введением гидрокортизона (контрольные животные в адекватном режиме получали по 0,3 мл физраствора). Гипокоортицизм вызывали удаляя надпочечники [7], гипоинсулинизм – поджелудочную железу (контролем служили ложноперирированные крысы). Гормональные эффекты оценивали на 8-ые сутки через час после однократной инъекции тиаминкиназы.

Забор образцов осуществлялся под тиопенталовым наркозом сразу после декапитации. Извлеченный материал немедленно замораживали и хранили в жидком азоте.

Постановка исследования с использованием лабораторных животных соответствовала рекомендациям Конвенции Совета Европы по охране позвоночных, используемых в экспериментальных и других научных целях (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals for Experimental and other Scientific Purposes: Strasbourg, Council of Europe, 51 pp; 18.03.1986). Директиве Совета ЕЭС от 24.11.1986 (Council Directive on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions of the Member States Regarding the Protection of Animal used for Experimental and Other Scientific Purposes) и рекомендациям FELASA Working Group Report (1994-1996), ТКП 125-2008 [8].

Скорость тиаминкиназной реакции регистрировали по наработке ТДФ. Реакционная смесь в своем составе содержала 2 мкМ тиамин, 2 мМ АТФ, 10 мМ MgSO₄, 0,02 М трис-НСІ буфера рН 8,6 и 100-200 мкг фермента в общем объеме 1 мл. В качестве контроля применяли те же ингредиенты, к которым добавляли 100-200 мкг изначально денатурированного белка. Удельную активность выражали в нмоль ТДФ, образовавшегося за 1 ч при 37°С в расчете на 1 мг киназы. Уровень ТДФ определяли с использованием высокоселективной системы апопируватдекарбоксилаза-алкогольдегидрогеназа. Реакцию запускали пируватом. О содержании ТДФ судили по изменению оптической плотности НАД·Н во времени при 340 нм за счет убыли его количества в пробе в процессе восстановления ацетальдегида, образовавшегося при декарбоксилировании пирувата до этилового спирта. Экспериментальные данные обрабатывали статистически с вычислением средних арифметических (M), среднеквадратических отклонений (SD) и квадратических ошибок репрезентативности средних арифметических (SEM). Для оценки достоверности разности средних величин применяли t-критерий Стьюдента. Все расчеты проводились с использованием программы GraphPad Prism 5.0.

Результаты исследований и их обсуждение. Гормональной регуляции принадлежит важная роль в поддержании гомеостаза и в адаптации обменных процессов к изменениям внутренней или внешней среды организма. Большинство проявлений гормональной регуляции связано с функцией ферментов, активность и количество которых изме-

няется посредством действия гормонов. Проведенный нами хроматографический анализ смеси гидрокортизона коры надпочечников и гомогенной тиаминкиназы мозга после их предварительной инкубации *in vitro* свидетельствует о лабильном связывании гормона с ферментным белком. Как следует из рисунка 1, в элюатах первых двенадцати фракций не фиксируется ни один из исходных компонентов смеси. В последующих четырех – обнаруживается белок и гидрокортизон. При дальнейшей элюции регистрируется только низкомолекулярный глюкокортикоид. Внесение в среду инкубации неионного детергента 0,05% тритона X-100, липофильные цепи которого взаимодействуя с гидрофобными поверхностями белка вытесняют его из комплекса, или 6 М мочевины, расщепляющей формирующиеся водородные связи, исключает связывание.

Комплексообразование с гидрокортизоном не затрагивает участки каталитического центра энзима и не влияет на конформационное состояние глобулы. Определение ферментативной активности тиаминкиназы в элюате 14-ой фракции (рисунок 1) показало, что при расчёте на единицу белка она равна исходной активности (таблица). Остаются неизменными в составе комплекса и другие молекулярно-кинетические показатели фермента. Однако устойчивость макромолекулы во времени увеличивается с 2-3 до 5-6 суток. Можно полагать, что те участки и функциональные группы, которые ответственны за связывание с гидрокортизоном, определяют ассоциацию нативной тиаминкиназы и на мембранных структурах головного мозга.

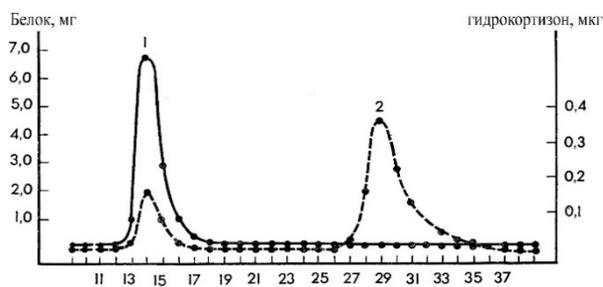


Рисунок 1. – Связывание тиаминкиназы мозга с гидрокортизоном. Сплошная линия (1) - энзим, пунктирная (2) – гидрокортизон. Здесь и на рисунке 2 по оси абсцисс – номера фракций (n=6)

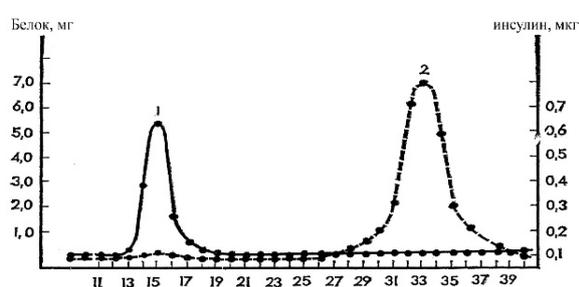


Рисунок 2. – Связывание тиаминкиназы мозга с инсулином. Сплошная линия (1) – энзим, пунктирная (2) – инсулин (n=6)

Таблица – Сравнение характеристик и кинетических параметров исходной мембрано-ассоциированной тиаминкиназы из мозга свиньи и в составе комплекса: 37°C, 10 mM трис-HCl буфер pH 8,6 (M ± SD, n=6)

Параметр	Фермент до инкубации	Фермент в составе комплекса
$V_{\text{макс.}}, \text{M} \cdot \text{c}^{-1}$	$2,82 \pm 0,04$	$2,76 \pm 0,03$
$k \text{ кат.}, 10^{-1}, \text{c}^{-1}$	$0,87 \pm 0,03$	$0,84 \pm 0,02$
Активность, $\text{нмоль} \cdot \text{ч}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$	$489 \pm 6,7$	$473 \pm 8,1$
$K_m \text{ для тиамина} \cdot 10^{-6}, \text{M}$	$0,72 \pm 0,05$	$0,57 \pm 0,06$
$K_m \text{ для комплекса } \text{Mg} \cdot \text{АТФ}^{-2} \cdot 10^{-4}, \text{M}$	$8,3 \pm 0,3$	$8,0 \pm 0,4$
$K_S \text{ для } \text{Mg}^{2+} \cdot 10^{-4}, \text{M}$	$4,0 \pm 0,2$	$3,9 \pm 0,1$
Оптимум pH	8,6	8,6
Устойчивость при 4°C, сут	2 – 3	5 – 6

Примечание – $p > 0,1$

В свете многочисленных фактов инсулиноподобного действия тиамина на обмен веществ [5, 9] вероятность гормонального опосредования его витаминных эффектов на уровне реакций синтеза фосфатов B_1 казалась весьма правдоподобной. Анализируя механизм молекулярного действия инсулина на ферментные системы на примере гексокиназы дрожжей ранее было постулировано [10],

что гормональный контроль скорости ферментативных процессов проявляется в том случае, если контактирующий с инсулином белок содержит свободные сульфгидрильные группы, определяющие его конформацию, и обладает четвертичной структурой с подвижными субъединицами. Это способствует формированию продуктивного гормон-ферментного комплекса путём замыкания дисульфидного мостика между свободной сульфгидрильной группой белковой молекулы и дисульфидной связью гормона:



Тиаминкиназа головного мозга содержит две свободные, не задействованные в каталитическом акте, тиольные группы, не имеет стабилизирующих молекулу S – S связей и характеризуется олигомерным строением с двумя идентичными полимерными цепями с молекулярной массой 26 кДа [11]. Выполненные нами исследования по изучению связывания фермента с инсулином в условиях *in vitro* (рисунок 2) не привели к комплексообразованию. Прослеживающийся незначи-

тельный подъём пика во фракции номер 15 находится в пределах ошибки эксперимента. Аналогично, не обнаружены позже авторами постулата гормон-ферментные комплексы и в молекулярных системах инсулина с альдолазой и гемоглобином, белками со свободными SH-группами и подвижными четвертичными структурами.

Предварительные опыты с внесением в среду тиаминкиназной реакции аликвот экзагенного инсулина также показали, что гормон в условиях *in vitro* не влияет на скорость фосфорилирования тиамина. При этом конечный результат не зависит от количества добавленного компонента.

В отношении механизма действия инсулина принципиален вопрос – проникает ли инсулин в клетки или же действие его основано на взаимодействии гормона с клеточными мембранами. Считается, что в отличие от липофильных гормонов (стероидные, тиреоидные гормоны, ретиноевая кислота) инсулин непосредственно не диффундирует через мембраны [12]. Однако относительно низкая молекулярная масса гормонального белка (6700 Да), его существование в виде нескольких форм в крови, при одновременно высокой концентрации участков связывания со специфическими рецепторами на поверхности мембран (клетка содержит до 10000 рецепторов с константой связывания порядка 10^{-10}M^{-1}) [13], постоянно требовало осторожности при интерпретации путей гормональной регуляции биохимических процессов [6, 14]. На настоящий момент выяснен механизм проницаемости инсулина и показано, что гормон изначально связывается со специфиче-

ческим гликопротеиновым рецептором, который содержит множество гликозильных остатков на поверхности клетки-мишени, вызывает изменение конформации рецептора, после чего гормон-рецепторный комплекс путём эндоцитоза проникает в цитозоль, распадается и внутри клетки генерируется аналитический сигнал [15]. Описанный процесс предопределяет возможность прямого взаимодействия инсулина с цитозольными или ассоциированными на внутренней поверхности мембраны ферментами.

Тем не менее, экстраполяция наших результатов на ситуацию *in vivo* затруднена ввиду традиционных возражений о нефизиологичности подобных опытов. Поэтому данные, полученный в эксперименте *in vitro*, требуют хотя бы косвенного подтверждения опытами *in vivo*. На наш взгляд существует хорошая возможность для такой проверки. Известно [5], что после однократного введения большой дозы тиамина в тканях животных уровень ТДФ вначале быстро увеличивается, а затем начинает снижаться. Если принять, что темп нарастания содержания кофермента в мозге соответствует скорости его биосинтеза, то измеряя тканевую концентрацию ТДФ через определенные промежутки времени, после нагрузки витамином, можно составить представление об активности его новообразования. Из этих же соображений скорость последующей нормализации уровня кофермента будет говорить об интенсификации работы ферментов его расщепляющих.

Таким образом, при анализе динамики изменения тканевого содержания кофермента

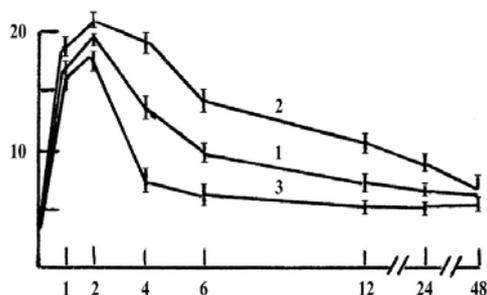


Рисунок 3. – Содержание ТДФ (мкмоль/кг ткани) в мозге интактных (1), адrenaлэктомированных (2) и получавших гидрокортизон (3) крыс через различные промежутки времени после однократного введения тиамина. По оси абсцисс – время, ч

во времени, после насыщения субстратами ферментных систем осуществляющих его биосинтез и деградацию, информативность регистрируемых измерений будет высока, так как по наклону восходящей и нисходящей ветвей концентрационной кривой в координатах уровень: время можно прямо, в сравнительном аспекте, судить о реальных процессах генерации и расщепления ТДФ в условиях *in vivo*. Результаты периодических измерений концентрации ТДФ в мозге крыс после однократного подкожного введения 200 мг/кг тиамина животным с различным гормональным фоном приведены на рисунке 3. Из полученных данных видно, что в течении первых часов опыта, когда тканевой уровень кофермента после введения избытка предшественника начинает резко увеличиваться, скорость набора высоты эффекта во всех сравниваемых группах практически одинакова и, следовательно, не зависит от исходного содержания гидрокортизона.

В то же время снижение (нормализация) уровня ТДФ после первичного увеличения концентрации кофермента, вызванного витаминной нагрузкой, протекает строго в рамках стероидзависимой динамики. Начиная со второго часа и во все последующие сроки опыта содержание ТДФ в мозге адrenaлэктомированных крыс оказывается выше, а у получавших гидрокортизон – ниже, чем у интактных животных.

Поскольку заметное отставание скорости убыли ТДФ имеет место на фоне гипокортицизма, а ускорение нормализации – при гиперкортицизме, можно предположить,

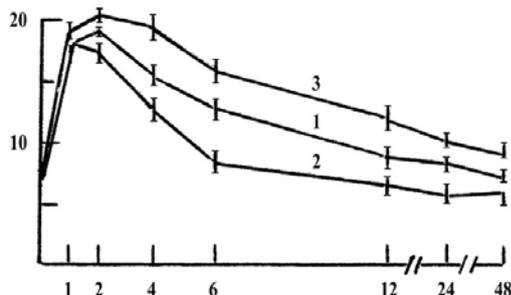


Рисунок 4. – Содержание ТДФ (мкмоль/кг ткани) в мозге интактных (1), панкреатэктомированных (2) и получавших инсулин (3) крыс через различные промежутки времени после однократного введения тиамина. По оси абсцисс – время, ч

что кортикостероиды стимулируют процессы тканевой «уборки» излишков кофермента, т.е. увеличивают активность гидролизующих его ферментов.

Таким образом, по совокупности полученных результатов, очевидно, можно заключить, что гормоны коры надпочечников не влияют на биосинтез кофермента, но способны контролировать его расщепление в мозге. Из рисунка 4, где приведены результаты измерения содержания ТДФ в первые часы после витаминной нагрузки, аналогично, как и из рисунка 3, следует, что нарастание уровня кофермента в мозге интактных, панкреатэктомированных (после удаления поджелудочной железы) и получавших инсулин крыс осуществляется примерно в одинаковом темпе.

Последнее свидетельствует об отсутствии существенных различий интенсивности биосинтеза кофермента в принятых условиях. Вместе с тем начиная со второго часа опыта, когда пик содержания ТДФ в мозге после достижения максимума идет на убыль, выявляется заметное отставание в скорости развития событий у интактных животных по сравнению с панкреатэктомированными и у крыс, получавших инсулин, по сравнению с интактными. Учитывая, что убыль кофермента в этот период определяется преобладанием его расщепления, то по активности данного процесса сравниваемые группы, очевидно, можно расположить в следующем порядке: гипоинсулинизм > контроль (интактные) > гиперинсулинизм. Такая градация поддерживает мнение о торможении инсулином реакций ферментативного дефосфорилирования ТДФ в мозге и по своему содержанию фактически совпадает с выводами [5] о гормональном контроле расщепления кофермента, но не его биосинтеза.

Заключение. Взаимодействие в молекулярной системе гидрокортизон-мембрано-ассоциированная тиаминкиназа головного мозга стабилизирует молекулу белка не влияя на её конформационное состояние и каталитическую активность. Гормоны коры надпочечников и поджелудочной железы непосредственно не участвуют в контроле биосинтеза коферментной формы витамина В₁, но способны регулировать её расщепле-

ние, характеризуясь реципрокностью действия.

Список литературы

1. Макарович, А. Ф. Тиаминтрифосфат: новый взгляд на некоферментную функцию витамина В₁ / А. Ф. Макарович. – Минск : Беларуская наука, 2008. – 430 с.
2. Аткинс, Р. Биодобавки доктора Аткинса: природная альтернатива лекарствам при лечении и профилактике болезней / Р. Аткинс. – М.: Риол Классик, 2000. – 474 с.
3. Громова, О. А. Клиническая фармакология тиамин и бенфотиамин: «старые» показания – новые обоснования молекулярного действия в норме и при некоторых заболеваниях / О. А. Громова // Репродуктивное здоровье детей и подростков. – 2008. – №1. – С.59-76.
4. Костеневич, Н. Н. Кинетический анализ тиаминкиназы из пивных дрожжей и головного мозга свиньи / Н. Н. Костеневич, И. П. Черникевич // Сборник статей Международной научно-практической конференции, посвященной 50-летию Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси. – Минск : ИВЦ «Минфина», 2021. – С.251-258.
5. Виноградов, В. В. Некоферментная витаминология / В. В. Виноградов. – Гродно, 2000. – 535 с.
6. Протасова, Т. Н. Гормональная регуляция активности ферментов / Т. Н. Протасова. – М.: Медицина, 1975. – 286 с.
7. Киршенблат, Я. Д. Практикум по эндокринологии / Я. Д. Киршенблат. – М.: «Высшая школа», 1969. – С.77.
8. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (*Electronic resource*) // Council of Europe. – Mode of access: <http://conventions.coe.int/Treaty/en/Treaties/Html/123.htm>. – Date of access: 10.11.2018.
9. Алешин, В. А. Механизмы некоферментного действия тиамин: белковые мишени и медицинское значение / В. А. Алешин, Г. В. Мкртчян, В. И. Буник // Биохимия. – 2019. – Т. 84, №8. – С.1051-1075.
10. Ильин, В. С. Гормон-ферментный комплекс инсулин - гексокиназа / В. С. Ильин,

- Г. В. Титова // Биохимия. – 1965. – Т.30, №6. – С.1251-1256.
11. Черникевич, И. П. Роль сульфгидрильных групп в проявлении ферментативной активности тиаминкиназы головного мозга свиньи / И. П. Черникевич, М.Ю. Вавренюк, К. В. Болтромаеюк // Журн. Гродн. гос. мед. ун-та. – 2016. – №3. – С.108-112.
12. Мецлер, Д. Биохимия / Д.Мецлер. – М.: Мир, 1980. – Т. 1 – 407 с.
13. Овчинников, Ю. А. Биоорганическая химия / Ю. А. Овчинников. – М.: Просвещение, 1987. – 815 с.
14. Основы биохимии ; под ред. проф. А. А. Анисимова. – М.: Высшая школа, 1986. – 551 с.
15. Чиркин, А. А. Биологическая химия / А. А. Чиркин, Е. О. Данченко, – Минск : Вышэйшая школа, 2017. – 431 с.
5. Vinogradov V.V. *Nekofermentnaya vitaminologiya: monografiya*. [Non-coenzymatic vitaminology: monograph]. Grodno, 2000. 535 p. (in Russian)
6. Protasova T.N. *Gormonalnaya regulyatsiya aktivnosti fermentov*. [The gormonal regulation of the activities of enzymes]. Moscow, Medicina, 1975. 286 p. (in Russian)
7. Kirshenblat Y.D. *Praktikum po endokrinologii* [Workshop on endocrinology]. Moscow, Vysshaya shkola, 1969. 77 p. (in Russian).
8. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (*Electronic resource*) // Council of Europe. – Mode of access: <http://conventions.coe.int/Treaty/en/Treaties/Html/123.Htm>. – Date of access: 10.11.2018.
9. Aleshin V.A. *Mehanizmy nekofermentnogo dejstviya tiamina: belkovye misheni i medicinskoe znachenie*. [Mechanisms of non-coenzymatic action of thiamine: protein targets and medical significance]. Biohimiya, 2019, vol. 84, no. 8, pp. 1051-1075. (in Russian)
10. Iljin V.S. *Gormon-fermentnyj kompleks insulin-geksokinaza*. [Hormone-enzyme complex insulin – hexokinase]. Biohimiya, 1965, vol. 30, no. 6, pp. 1251-1256. (in Russian)
11. Chernikevich I.P. *Rol sulfgidrilnyh grupp v proyavlenii fermentativnoj aktivnosti tiaminlinazy golovnogogo mozga svinji*. [Role of sulfhydryl groups in the manifestation of enzymatic activity of thiamine kinase from pig's brain]. Journ. Grodno. gos. med. un-ta. 2016, vol. 3. pp. 108-112. (in Russian)
12. Metsler D. *Biohimiya*. [Biochemistry]. Moscow, Mir, 1980, vol. 1. 407 p. (in Russian).
13. Ovchinnikov U.A. *Bioorganicheskaya himiya*. [Bioorganic chemistry]. Moscow, Prosveshcheniye, 1987. 815 p. (in Russian)
14. Anisimov A.A. *Osnovy biohimii*. [Bases of biochemistry]. Ed. Anisimov A.A. Moscow, Vysshaya shkola, 1986. 551 p. (in Russian).
15. Chirkin A.A. *Biologicheskaya himiya*. [Biochemistry]. Minsk, Vyshejschaya shkola, 2017. 431 p. (in Russian)

Received 15 April 2024