

Действительный член Академии медицинских
наук СССР А. Е. БРАУНШТЕЙН и Е. Ф. ЕФИМОЧКИНА

ВЛИЯНИЕ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ НА СИНТЕЗ ГИППУРОВОЙ КИСЛОТЫ В ОРГАНИЗМЕ КРЫСЫ

Пантотеновая кислота (ПК) принадлежит к витаминам комплекса В. Свои биологические функции она выполняет, входя в состав коэнзима ацетилирования («коэнзима А»), открытого Липманом (1). В клетках животных тканей и микроорганизмов практически вся ПК содержится в виде коэнзима А, связанного с белками. Этот коэнзим участвует в биологическом окислении уксусной и пировиноградной кислот, в синтезе ацетилхолина и ацетоуксусной кислоты и в ферментативном ацетилировании ароматических аминов (сульфаниламида, *p*-аминобензойной кислоты) (2). Все эти процессы протекают с участием аденозинтрифосфата (АТФ). По данным Липмана (2, 3), ферментные вытяжки печени и бактерий в присутствии коэнзима А образуют из ацетата и АТФ реакционноспособное производное уксусной кислоты (возможно, смешанный ангидрид уксусной кислоты и замещенной фосфорной кислоты (2)), которое и служит промежуточным продуктом (ацетилирующим агентом) при указанных процессах ферментативного ацетилирования.

В настоящее время установлено, что биологический синтез ряда кислотных амидов, близких к пептидам (гиппуровых кислот (4), глутамина (2)), самих пептидов (например, глутатиона (4, 5, 2)) и, повидимому, также белков протекает с использованием энергии лабильных фосфатных остатков АТФ. Весьма вероятно, что при этих синтезах СО—NH-связей, как и при ферментативном ацетилировании, в промежуточной реакции образуется производное кислотного остатка с активной карбоксильной группой (по типу ацетилфосфата) (4, 5, 2).

Сходство ферментных систем и механизма реакций при ацетилировании ароматических аминов и при синтезе других кислотных амидов и пептидов дает основание предполагать, что коэнзим А играет более общую роль в процессах биологического синтеза СО—NH-связей и, тем самым, в синтезе белков (6). При этом функции коэнзима А могут быть двоякими. С одной стороны, возможно непосредственное участие его в образовании промежуточных продуктов с активированной СООН-группой, в качестве «коэнзима ацилирования» в широком смысле. С другой стороны, он может действовать косвенно, участвуя в синтезе АТФ путем фосфорилирования, сопряженного с окислением пировиноградной и уксусной кислот в цикле трикарбоновых кислот.

Наше предположение о роли коэнзима А в биосинтезе СО—NH-связей подтверждается экспериментальными данными, полученными в настоящей работе при исследовании влияния недостаточности ПК на синтез гиппуровой кислоты в организме крысы (6). Ранее нами было показано, что синтез гиппуровой и фенацетуровой кислот в животных тканях протекает без участия энзимов, гидролизующих эти соединения

(«гистозима»), и требует условий, обеспечивающих образование АТФ путем сопряженного фосфорилирования (Е. Ефимочкина).

Изложенные ниже опыты показали со всей отчетливостью, что способность живой крысы к синтезу гиппуровой кислоты при нагрузке бензойной кислотой (и гликоколлом) по мере развития недостаточности ПК резко снижается (в среднем на 50%). У ПК-авитаминозных крыс величины синтеза гиппуровой кислоты чрезвычайно быстро восстанавливаются до нормы после инъекции ПК. Известно, что у крыс на рационе, не содержащем ПК, развивается не полная недостаточность ПК, а лишь относительный гиповитаминоз, при котором в тканях сохраняется еще около 50% нормальной концентрации коэнзима А (7), — повидимому, благодаря синтезу ограниченных количеств ПК бактериальной флорой кишечника. Этим объясняется то, что у крыс синтез гиппуровой кислоты нарушается лишь при длительном пребывании на диете без ПК и не прекращается полностью. С этим обстоятельством связано и то, что мы в ориентировочных опытах с переживающими срезами печени ПК-авитаминозных крыс находили лишь незначительное и непостоянное снижение синтеза гиппуровой кислоты «в пробирке» и не наблюдали увеличения синтеза при добавлении ПК к ткани. Для изучения влияния ПК на синтез СО—NH-связей в изолированных ферментных системах и для выяснения механизма этого влияния потребуется использование более благоприятных биологических объектов и применение препаратов коэнзима А.

Экспериментальная часть

Методика. Молодые крысы (начальный вес 35—45 г) содержались на синтетическом рационе без ПК, состоящем из очищенного казеина (18%), сахарозы (75%), подсолнечного масла (3%), солевой смеси Хегстеда (4%). Ежедневная добавка витаминов состояла из тиамина, рибофлавина, пиридоксина (по 40 γ на крысу), *p*-аминобензойной кислоты (100 γ), никотиновой кислоты (150 γ), холин-хлорида (10 мг), витамина А (100 м. е.); два раза в неделю крысам давали по 2 капли рыбьего жира. К рациону контрольных крыс добавляли 150 γ в день *dl*-пантотената кальция. Развитие недостаточности ПК проявлялось в остановке роста и постепенном появлении характерных симптомов ПК-авитаминоза: специфического дерматита, розоватого налета на шерсти головы и шеи, облысения, цианоза лапок.

Периодически крысам давали с питьевой водой нагрузку из 40 мг бензойнокислого натра, 50 мг гликоколла и 1 г сахара (для маскировки вкуса); крысы выпивали раствор без остатка. Моча каждой крысы собиралась количественно в течение суток после приема бензойной кислоты и исследовалась на содержание гиппуровой кислоты. Гиппуровая кислота извлекалась эфиром из подкисленной пробы мочи, гидролизовалась с конц. HCl и в гидролизате определялся гликоколл нингидриновым методом Александра.

Результаты опытов. Нормальные крысы, получающие обычный смешанный корм или синтетический рацион с ПК, выделяют в сутки не свыше 1,5 мг связанного, эфирорастворимого гликоколла. После приема 40 мг бензойнокислого натра (с гликоколлом) такие крысы выделяют в среднем 18 мг гликоколла в виде гиппуровой кислоты, что соответствует 81% введенной бензойной кислоты. При повторных нагрузках через различные промежутки времени выделение гиппуровой кислоты несколько колеблется, составляя от 100 до 70% от введенной бензойной кислоты, но никогда не бывает у контрольных крыс ниже 65% теоретически возможного.

После перевода крыс на рацион без ПК синтез гиппуровой кислоты в первое время протекает с нормальной интенсивностью, но по мере

развития недостаточности ПК величины синтеза гиппуровой кислоты после нагрузок начинают снижаться. У некоторых животных нарушение синтеза наступает уже в начале третьей недели содержания на ПК-авитаминозном рационе; у других крыс еще на 33—35-й день наблюдаются нормальные величины синтеза (73—79%), и только после 40—50 дней пребывания на рационе без ПК наступает стойкое и выраженное снижение образования гиппуровой кислоты из бензойной, иногда до 30—25% теории. Результаты части опытов приведены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние недостаточности ПК на синтез гиппуровой кислоты в организме крысы. (Количество гиппуровой кислоты в суточной моче выражено в % от введенной бензойной кислоты. Инъекции ПК — по 1 мг Na-соли — помечены вертикальной стрелкой ↓. В скобках указан день от начала опыта, когда крыса получала бензойную кислоту или ПК)

№ п/п	Выделение гиппуровой кислоты (в %) и дни от начала опыта, когда давалась нагрузка					
Контрольные крысы (синтетический рацион с ПК)						
1	90 (21)	68 (38)	87 (49)			
2	97 (21)	70 (38)	75 (49)	80 (65)		
3	73 (10)	99 (25)				
4	73 (10)	65 (33)	↓, ↓ (36, 37)	83 (38)		
5	85 (13)	108 (28)				
ПК-авитаминозные крысы (синтетический рацион без ПК)						
6	84 (21)	68 (38)	34 (52)			
7	75 (21)	39 (38)	53 (49)	26 (65)		
8	107 (5)	54 (16)	28 (30)			
9	84 (5)	45 (18)	36 (30)			
10	77 (13)	79 (35)	44 (48)	↓ (51)	60 (52)	
11	77 (13)	76 (35)	46 (48)	↓ (51)	85 (55)	
12	68 (14)	73 (33)	59 (48)	↓ 51 (54)	↓ (56)	62(57) 98(60)
13	75 (43)	40 (49)	34 (54)	↓ (56, 57)	81 (57)	
14	55 (14)	42 (25)	41 (33)	↓ (36, 37)	81 (40)	

Данные табл. 2 показывают прогрессирующее снижение величин синтеза по мере развития недостаточности ПК. Следует отметить, что проверочные анализы мочи за вторые сутки после нагрузки показали как у нормальных, так и у ПК-авитаминозных крыс отсутствие гиппуровой кислоты. Следовательно, при недостаточности ПК действительно имеет место нарушение синтеза гиппуровой кислоты, а не замедление ее выделения почками.

Некоторые ПК-авитаминозные крысы после падения синтеза гиппуровой кислоты до низких величин подвергались лечению путем одной или двух (2 дня подряд) инъекций Na-пантотената (1 мг под кожу). Тотчас после инъекции или через 2—4 дня давалась повторная нагрузка бензойной кислоты и исследовалось суточное выделение гиппуровой кислоты. Данные, приведенные в табл. 1, показывают со всей отчетливостью, что величины синтеза гиппуровой кислоты нарастают тотчас после введения в организм ПК и достигают верхних пределов нормы через 2—3 дня, т. е. задолго до исчезновения внешних признаков недостаточности ПК и восстановления общей упитанности животных. Интересно, что и у контрольной крысы № 4, у которой синтез гиппуровой

кислоты держался на низких величинах несмотря на полноценный рацион, инъекция ПК вызвала немедленное повышение синтетической способности.

Таблица 2

Средние величины синтеза гиппуровой кислоты (в %) в зависимости от продолжительности содержания крыс на экспериментальном рационе

Р а ц и о н	День от начала опыта, когда давалась бензойная кислота		
	1—20-й	21—40-й	41—65-й
Синтетич. с ПК (контроль)	77	82	81
Синтетич. без ПК (авитаминоз)	71	58	43

В ы в о д ы

При экспериментальной недостаточности пантотеновой кислоты интенсивность синтеза гиппуровой кислоты у крыс прогрессивно снижается (до 50% нормы и ниже). После одной или двух инъекций ПК величины синтеза гиппуровой кислоты быстро нарастают до верхних пределов нормы. Эти данные подтверждают предположение авторов, что ПК (или коэнзим А) принимает участие не только в реакциях энзиматического ацетилирования, но и в более широком круге процессов синтеза кислотно-амидных (пептидных) связей.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
26 XI 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ F. Lipmann, c. s., Journ. biol. Chem., 167, 869 (1947); 177, 97 (1949).
- ² F. Lipmann, Adv. Enzymol., 6, 231 (1946); Ann. Rev. Biochem., 18, 267 (1949).
- ³ F. Lipmann and L. Tuttle, Journ. biol. Chem., 161 415 (1945).
- ⁴ А. Браунштейн, Тр. 4-й сессии АМН СССР, М., 1948, стр. 202.
- ⁵ А. Браунштейн, Г. Шамшикова и А. Иоффе, Биохимия, 13, 95 (1948).
- ⁶ А. Браунштейн, Тезисы докладов 2-й сессии Медико-биолог. отд. АМН СССР, 1949, стр. 32.
- ⁷ R. Olson and N. Kaplan, Journ. biol. Chem., 175, 515 (1948).