

Действительный член Академии медицинских наук СССР А. Е. БРАУНШТЕЙН и Р. М. АЗАРХ

## ОБ УЧАСТИИ ВИТАМИНА В<sub>6</sub> В ЭНЗИМАТИЧЕСКОМ ОБРАЗОВАНИИ СЕРОВОДОРОДА ИЗ L-ЦИСТЕИНА

Установлено, что витамин В<sub>6</sub> в форме фосфопиридоксаль служит простетической составляющей целого ряда энзимов аминокислотного обмена — аминотераз, аминокислотных декарбоксилаз, кинурениназы, триптофаназы бактерий, а также ферментной системы плесеней и бактерий, синтезирующей триптофан из индола и серина (1-6). Однако многообразная роль витамина В<sub>6</sub> в азотистом обмене, повидимому, не исчерпывается этими его функциями. В частности, имеется основание предполагать, что витамин В<sub>6</sub> принимает непосредственное участие в обмене серина и цистина у животных и микроорганизмов. На это указывают следующие факты:

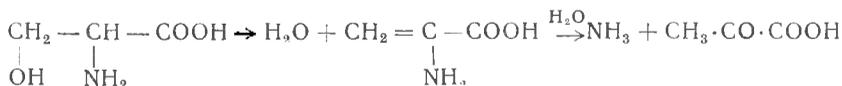
1. Витамин В<sub>6</sub> служит эффективным противоядием при интоксикации, вызываемой у крыс нагрузкой DL- или D-серином (7).

2. Некоторые молочнокислые бактерии при выращивании на среде, не содержащей витамина В<sub>6</sub>, теряют свойственную им способность к синтезу цистина (8).

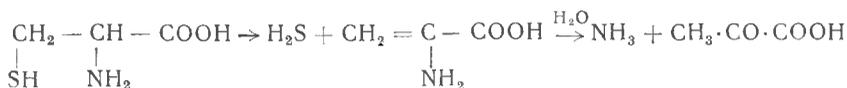
3. У крыс добавление цистина или метионина к синтетическому пищевому рациону повышает потребность в витамине В<sub>6</sub> и значительно ускоряет развитие явлений В<sub>6</sub>-авитаминоза (9).

4. Анаэробное расщепление серина на Н<sub>2</sub>О, NH<sub>3</sub> и пировиноградную кислоту сериндегидратазой и расщепление цистеина на Н<sub>2</sub>S, NH<sub>3</sub> и пировиноградную кислоту цистеиндесульфгидразой представляет большое сходство с действием бактериальной триптофаназы, активной группой которой служит фосфопиридоксаль. При всех этих реакциях (см. схемы А, Б, В) промежуточным продуктом, по видимому, является α-аминоакриловая кислота (1, 10-13). По мнению ряда авторов, сериндегидратаза и цистеиндесульфгидраза тождественны (11, 12).

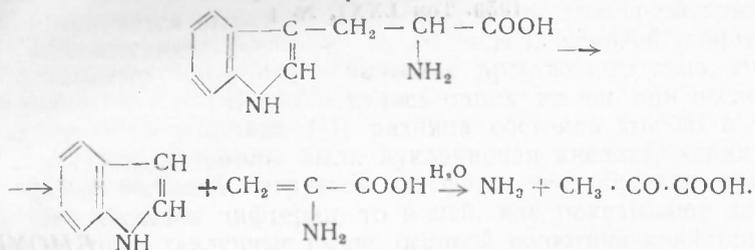
### А. Сериндегидратаза



### Б. Цистеиндесульфгидраза



В. Триптофаназа



5. Действие цистеиндесульфгидразы интенсивно тормозится реактивами на СО-группу — KCN, гидроксиламином, фенилгидразином, семикарбазидом и др. (<sup>10, 11, 13</sup>), аналогично действию триптофаназы и других пиридоксальных энзимов, упомянутых в начале этой статьи.

Эти факты побудили нас приступить к исследованию роли витамина В<sub>6</sub> в энзиматических превращениях серина и цистина, и в первую очередь, к изучению влияния В<sub>6</sub>-авитаминоза на действие сериндегидратазы и цистеиндесульфгидразы животных тканей. Мы не смогли добиться достаточно интенсивного анаэробного дезаминирования серина в тканях нормальных животных в условиях, описанных в литературе, и потому сосредоточили свое внимание сперва на цистеиндесульфгидразе. Действие этого энзима, открытого Фромажо (1938 г.) и изучавшегося также некоторыми другими авторами (<sup>10, 11, 13, 1</sup>), лежит в основе образования сероводорода при гниении белков и при анаэробном автолизе печени и других органов животных. Оно представляет один из основных механизмов минерализации белковой серы у бактерий и в организме животных.

Изложенные ниже опыты подкрепили наше предположение, что витамин В<sub>6</sub>, по всей вероятности, в форме фосфопиридоксала, принимает непосредственное участие в энзиматической десульфурации L-цистеина (<sup>2</sup>).

Мы установили, что активность цистеиндесульфгидразы в экстрактах из печени крыс резко снижается или исчезает полностью уже через 4—7 дней после перевода животных на синтетический рацион, не содержащий пиридоксина, т. е. задолго до появления внешних признаков В<sub>6</sub>-авитаминоза или заметного нарушения активности таких пиридоксальных энзимов, как аминоферазы или кинурениназа (<sup>1, 4</sup>). Лечение животных пиридоксином, даже при далеко зашедшем В<sub>6</sub>-авитаминозе, столь же быстро (за 1—3 дня) восстанавливает активность десульфгидразы печени до нормальных величин. Эти данные, в сопоставлении с полным торможением цистеиндесульфгидразы реагентами на СО-группу (<sup>10, 11, 13</sup>), с определенностью говорят о том, что витамин В<sub>6</sub> действует на десульфурацию L-цистеина не косвенно и не как дополнительный активатор, а как неотъемлемая составляющая энзиматической системы десульфгидразы — в виде фосфопиридоксала или в составе более сложной простетической группы.

При попытках восстановить активность энзима в печени В<sub>6</sub>-авитаминозных животных «в пробирке», путем добавления фосфопиридоксала к экстракту или путем инкубирования срезов печени с пиридоксином, мы пока не добились существенного и регулярного успеха; изучение природы простетической группировки десульфгидразы нами продолжается.

### Экспериментальная часть

Методика. Молодые крысы (весом 40—50 г) содержались на синтетическом рационе без витамина В<sub>6</sub>, содержащем 40% казеина (состав рациона см. (<sup>4</sup>)); высокобелковые диеты, как известно, уско-

ряют развитие  $B_6$ -авитаминоза (8)). Контрольные крысы получали тот же рацион с добавлением 100 $\gamma$  пиридоксингидрохлорида в день или обычный смешанный корм.

Из печени крысы готовился энзиматический экстракт путем растирания ткани с 2 объемами 0,9% раствора NaCl и с песком (на льду) и центрифугирования. Активность десульфгидразы в экстракте определялась по Фромажо (13) путем иодометрического титрования  $H_2S$ , отщепляемого в анаэробных условиях от L-цистеина.

Для этой цели экстракт (3 мл), 0,1 M фосфатный буфер pH 7,2 (3 мл) и нейтрализованный раствор солянокислого L-цистеина (6 мг в 0,5 мл воды) вносили в охлажденные сосудики со шлифом, приспособленные для пропускания газов через опытную смесь; добавляли 0,2 мл толуола и 0,1 мл октилового спирта и заполняли газовое пространство чистым азотом. Пробы инкубировали 3 часа при 37° с качанием, затем охлаждали, подкисляли прибавлением (без доступа воздуха) 2 мл 10%  $H_2SO_4$  и вытесняли сероводород током  $CO_2$  в поглотитель с раствором уксуснокислых солей цинка и кадмия. Желтый осадок сульфидов отделяли центрифугированием, промывали водой (10 мл). К осадку приливали 2 мл 0,02 N  $J_2$ , 3 мл разведенной (1:1) соляной кислоты, 1 мл 10% KJ и титровали из микробюретки избыток иода 0,01 N раствором гипосульфита (1 мл 0,01 N гипосульфита соответствует 170 $\gamma$   $H_2S$ ).

Результаты опытов. Данные наших опытов по определению активности цистеиндесульфгидразы в печени нормальных и  $B_6$ -авитаминозных крыс суммированы графически на рис. 1, где каждая точка представляет величину образования  $H_2S$  в экстракте печени одной крысы. Из рис. 1 видно, что экстракты из печени крыс, получающих смешанный корм, образуют в условиях нашего опыта из L-цистеина обычно от 50 до 105  $\gamma$   $H_2S$ ; лишь в единичных случаях активность выше или ниже. При синтетической диете с пиридоксином (100  $\gamma$  в день) активность десульфгидразы близка к верхним границам активности при обычном корме (72—107  $\gamma$ ).

Авитаминозные крысы в первой серии опытов исследовались после 30—70 дней содержания на рационе без пиридоксина, при наличии выраженных симптомов  $B_6$ -недостаточности (акродинии); у всех этих животных активность десульфгидразы была резко снижена — от 0 до 40  $\gamma$   $H_2S$ . Дальнейшие опыты показали, что потеря активности энзима наступает уже на самых ранних стадиях недостаточности витамина  $B_6$ , представляя одно из первых ее проявлений. Уже на четвертый день количество образующегося сероводорода не превышает 36  $\gamma$ , а в большинстве случаев равно нулю.

Введение пиридоксина (100  $\gamma$  в день с пищей или под кожу) восстанавливает активность десульфгидразы печени до нормальных величин уже через 1—2 дня, вне зависимости от продолжительности предшествовавшего авитаминоза (табл. 1). Только в двух опытах экстракты

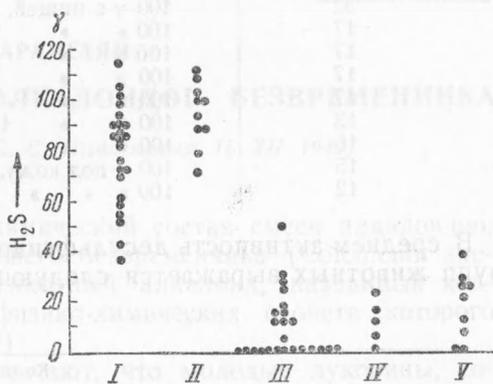


Рис. 1. Активность цистеиндесульфгидразы в экстрактах печени нормальных и  $B_6$ -авитаминозных крыс. Рацион: I — смешанный корм; II — синтетический рацион +100 $\gamma$  пиридоксина; III — синтетический рацион без пиридоксина 4—10 дней; IV — как III, 12—22 дня; V — как III, 30—70 дней (каждая точка соответствует печени одной крысы)

из печени крыс, получавших пиридоксин в течение 2 и 9 дней, были неактивными.

Таблица 1

Активность цистеиндесульфгидразы в печени  $V_6$ -авитаминозных крыс, леченных пиридоксином

Продолжительность авитаминоза в днях	Введение пиридоксина	Образование $H_2S$ в опытной пробе, в $\gamma$
32	100 $\gamma$ с пищей, 2 дня	112
17	100 » » 9 дней	114
17	100 » » 9 »	0
17	100 » » 3 дня	107
17	100 » » 8 дней	88
13	100 » » 15 »	129
10	100 » » 1 день	80
15	100 $\gamma$ под кожу, 2 дня	0
12	100 » » 1 день	80

В среднем активность десульфгидразы в печени всех исследованных групп животных выражается следующими величинами:

Таблица 2

	Контрольные		$V_6$ -авитаминозные	
	смешан. корм	синтетич. рацион + 100 $\gamma$ пиридоксина	нелеченные	леченные пиридоксином
Число опытов . . . . .	(22)	(10)	(36)	(14)
Образование $H_2S$ в $\gamma$ во всей опытной пробе . . . . .	87	96,4	14	84

### Выводы

Активность цистеиндесульфгидразы в экстракте из печени крыс резко снижается или полностью исчезает уже через 4 дня после перевода животных на рацион без витамина  $V_6$ . Вне зависимости от продолжительности  $V_6$ -авитаминоза, нормальная активность цистеиндесульфгидразы восстанавливается после введения 100  $\gamma$  пиридоксина с пищей или под кожу в течение 1 или 2 дней. Эти данные и высокая чувствительность энзима к реактивам, блокирующим СО-группу (<sup>10</sup>, <sup>11</sup>, <sup>13</sup>) указывают на то, что витамин  $V_6$  входит в состав простетической группы десульфгидразы, вероятно — в форме фосфопиридоксиала.

Институт биологической и медицинской химии  
Академии медицинских наук СССР

Поступило  
26 XI 1949

### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. Браунштейн, Биохимия аминокислотного обмена, М., 1949. <sup>2</sup> А. Браунштейн, Тезисы докладов 2-й сессии Отделения медико-биологич. наук АМН СССР, 1949, стр. 32. <sup>3</sup> А. Браунштейн, ДАН, **65**, 715 (1949). <sup>4</sup> А. Браунштейн и Е. Горяченкова, Биохимия, **14**, 163 (1949). <sup>5</sup> С. Мардашев и Р. Эттингер, Биохимия, **13**, 402 (1948). <sup>6</sup> А. Труфанов, Усп. совр. биол., **25**, 19 (1945). <sup>7</sup> W. Fishman and C. Artom, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **57**, 241 (1944). <sup>8</sup> M. Speck and D. Pitt, Science, **106**, 420 (1947). <sup>9</sup> L. Cerecedo, c. s., Arch. Biochem., **17**, 397 (1948). <sup>10</sup> C. Fromageot, Advanc. Enzymol., **7**, 369 (1947). <sup>11</sup> C. Smythe, ibid., **5**, 237 (1945). <sup>12</sup> E. Chargaff and D. Sprinson, Journ. biol. Chem., **148**, 249; **151**, 273 (1943); F. Binkley, ibid., **150**, 261 (1943). <sup>13</sup> C. Fromageot, c. s., Enzymologia, **6**, 80 (1939); **9**, 190 (1941); **11**, 81, 235, 253 (1943).