

Действительный член Академии медицинских наук СССР
А. Е. БРАУНШТЕИН и Е. В. ГОРЯЧЕНКОВА

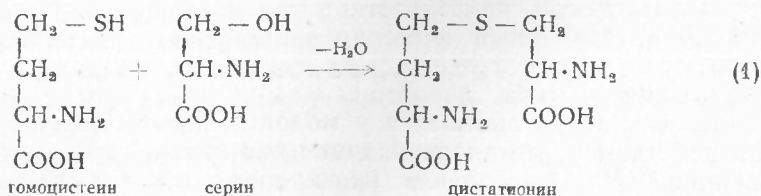
УЧАСТИЕ ВИТАМИНА В₆ В ОБРАЗОВАНИИ ЦИСТЕИНА ПУТЕМ ЭНЗИМАТИЧЕСКОГО ПЕРЕНОСА СЕРЫ

В биохимической литературе последних лет накопился ряд данных, свидетельствующих прямо или косвенно об участии витамина В₆ в процессах обмена цистина и серина (1-3). В связи с этим в нашей лаборатории предпринят ряд исследований о функциях этого витамина в биохимических превращениях содержащих серу аминокислот. В предыдущих сообщениях было показано, что в печени крыс уже на ранних стадиях авитаминоза В₆ резко снижается активность цистеиндесульфгидразы (2) и специфической декарбоксилазы, превращающей цистеиновую кислоту в таурин (4). Действие обоих энзимов интенсивно тормозится реагентами, блокирующими СО-группы. Эти факты указывают на то, что активная группа декарбоксилазы цистеиновой кислоты и десульфгидразы содержит витамин В₆ в альдегидной форме, вероятно в виде фосфопиридоксаля, хотя добавлением последнего „в пробирке“ пока не удалось восстановить активность этих энзимов в экстрактах В₆-авитаминозной печени.

Упомянутыми функциями витамина В₆ его роль в обмене содержащих серу аминокислот не ограничивается. Как установлено Спеком и Питт (3), некоторые молочнокислые бактерии способны синтезировать цистин только при наличии в питательной среде пиридоксаля или пиридоксамина; авторы предполагают, что цистин образуется из присутствующих в среде метионина и серина. Отмеченный факт дает основание предполагать, что витамин В₆ в той или иной форме входит в состав ферментной системы, осуществляющей превращение метионина в цистин. Этим превращением, как известно, определяется также заменимость цистина в питании животных и человека.

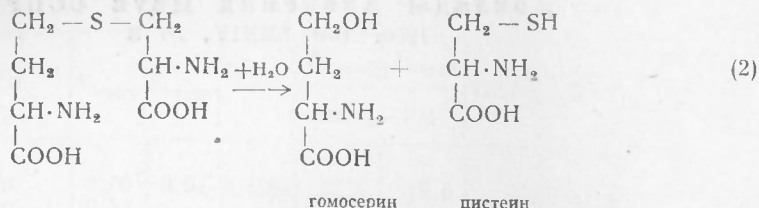
Основным звеном этого превращения является процесс энзиматического переноса серы метионина, или пересульфирование (транссульфурация); акцептором серы служит молекула *L*-серина. Этот процесс протекает, повидимому, через следующие стадии (5):

- L*-метионин деметилируется (неизученным путем) в гомоцистеин;
- гомоцистеин конденсируется с *L*-серином в тиоэфир — цистатионин:



в) цистатионин подвергается энзиматическому расщеплению с образованием цистеина. Механизм расщепления в деталях не изучен. Установлено, что оно сопровождается, в экстрактах из печени, образованием α -кетомасляной кислоты и NH_3 . В тех же условиях эти вещества образуются из гомосерина; вполне вероятно, что последний

является вторым непосредственным продуктом расщепления цистатионина:



В настоящей работе нами установлено, что процесс переноса серы с гомоцистеина на серин в экстрактах печени крысы (т. е. двуступенчатое превращение 1 + 2) тормозится на 60—70% ферментными ядами, связывающими СО-группы. Далее, было исследовано влияние недостаточности витамина В₆ на это превращение. Мы убедились, что активность ферментной системы пересульфирования значительно снижается уже на ранних стадиях В₆-авитаминоза (на 8-й день на 60%). После введения авитаминозным крысам пиридоксина (2—3 инъекции) интенсивность пересульфирования в печени восстанавливается полностью.

Интенсивность процесса пересульфирования в экстрактах печени В₆-авитаминозных крыс удается повысить „в пробирке“ в 2¹/₂ раза (т. е. до нижних пределов нормы) добавлением 10 γ синтетического фосфопиридоксаля (или природной кодекарбоксилазы). В тех же условиях добавление пиридоксаля и АТФ дает иногда незначительное активирование переноса серы, тогда как пиридоксин не активирует этого процесса.

Эти результаты не оставляют сомнения в том, что образование цист(е)ина путем пересульфирования в организме животных (и, очевидно, также у бактерий⁽³⁾) протекает при участии фосфопиридоксалевого энзима. Остается пока невыясненным, производит ли этот энзим только конденсацию гомоцистеина с серином (реакцию 1) или расщепление цистатионина (реакцию 2), или же обе эти реакции осуществляются одним и тем же энзимом.

В свете полученных нами данных особый интерес приобретают недавние опыты Бинкли⁽⁷⁾, который при далеко идущей очистке энзима печени, расщепляющего цистатионин (согласно реакции 2), наблюдал на всех стадиях обработки параллельное нарастание активности этого энзима и присутствующей в тех же препаратах цистеиндесульфгидразы. Весьма сходны и все свойства этих энзимов; Бинкли высказывает предположение об их идентичности. По данным А. Е. Браунштейна и Р. М. Азарх⁽²⁾, десульфгидраза также является, по видимому, пиридоксаль-протеидом. Однако совокупность имеющихся в нашем распоряжении данных пока говорит скорее в пользу близкого сходства, чем полного тождества энзимов десульфирования и пересульфирования.

Экспериментальная часть

В₆-авитаминоз вызывался у молодых крыс (самцы весом 40—50 г) посредством синтетической диеты без витамина В₆, содержащей 40% казеина^(2, 8). Контрольные крысы получали тот же рацион с добавлением 100 γ солянокислого пиридоксина в день или смешанный корм. Субстратами служили DL-серин и DL-гомоцистеин, приготовленный нами из DL-метионина путем восстановления металлическим натрием в жидком аммиаке⁽⁹⁾. Фосфопиридоксаль (синтетическая

Ва-соль, см. (8)) и кодекарбоксилаза (Pb-соль, полученная из дрожжей; 1 мг \cong 5 γ фосфопиридоксала) для употребления переводили в Na-соль обменным разложением с Na₂SO₄.

Энзиматический экстракт из печени крыс приготавливался путем растирания ткани на льду с 2 объемами 0,9% раствора NaCl и песком и центрифугирования с охлаждением.

Опытные пробы содержали 1 мл экстракта печени, 4 мг DL-гомоцистеина, 20 мг DL-серина, фосфатный буфер (M/45, pH 7,4); объем проб 5,2 мл. Для торможения десульфирования образующегося цистеина в пробы добавляется нейтрализованный раствор KCN в концентрации $4 \cdot 10^{-4}$ M. Опытные и контрольные пробы инкубировали с качанием в атмосфере чистого азота в течение 4 час. при 38°. Затем пробы освобождали от белков трихлоруксусной кислотой и нейтрализованные фильтраты аэрировали 1 час для окисления цистеина в цистин. Содержание последнего определяли по методу Салливана в фотометре Пульфриха (калибровочный график устанавливался по стандартному раствору цистина).

Величины пересульфирования (разность содержания цистеина между пробами, инкубированными с субстратами и без субстратов) выражены в микрограммах цистеина на 1 г ткани печени.

Результаты опытов. В экстрактах печени нормальных крыс, получающих смешанный корм, величины пересульфирования составляют в среднем 1150 γ цистеина (см. табл. 2).

Как показано в табл. 1, химические агенты, блокирующие карбонильную группу, а именно гидроксилламин, семикарбазид и фенилгидразин, при концентрации 10^{-3} M тормозят образование цистеина на 54—67%; наибольшее торможение вызывает гидроксилламин. Как известно, цистеиндесульфгидраза значительно более чувствительна к тем же ядам: 10^{-4} M гидроксилламин тормозит ее действие на 96% (5).

Таблица 1

Влияние химических агентов на процесс пересульфирования

Концентрация яда в M	Фенилгидразин		Гидроксилламин		Семикарбазид	
	образование цистеина в γ /г	торможение в %	образование цистеина в γ /г	торможение в %	образование цистеина в γ /г	торможение в %
0 (контроль)	1323	—	1232	—	1232	—
$2 \cdot 10^{-3}$	432	67,3	—	—	—	—
10^{-3}	606	54,1	41,1	66,7	52,2	57,8
10^{-4}	873	34,0	—	—	—	—

Данные табл. 2 показывают, что в печени контрольных крыс, получающих синтетический рацион с пиридоксином, величина пересульфирования в $1\frac{1}{2}$ — 2 раза выше, чем при обычном, смешанном корме, составляя в среднем 1690 γ /г (максимальная величина 2341 γ /г соответствует переносу 46% серы L-формы добавленного гомоцистеина). В печени крыс, находившихся на синтетической В₆-авитаминозной диете от 1 до 4 недель, образование цистеина путем пересульфирования резко снижено и составляет от 293 до 696 γ /г (в среднем 437 γ /г, или на 75% ниже, чем у контролей, получающих пиридоксин).

У крыс, которым после 18-дневного авитаминоза в течение 3 дней вводили под кожу по 100 γ пиридоксина, величины пересульфирования восстановились до уровня контрольных крыс, а именно до 1639, 1606 и 2028 γ /г цистеина.

В экстрактах печени В₆-авитаминозных крыс активность ферментной системы повышалась в 2,5 раза при добавлении „в пробирке“ 10 γ

фосфопиридоксала на пробу и в 1,5—2 раза при добавлении препарата природной кодекарбоксилазы в эквивалентной концентрации. Незначительная активация наблюдалась иногда также в присутствии пиридоксала (300 γ) и АТФ ($5 \cdot 10^{-4}$ М), тогда как добавление пиридоксина (300 γ) не влияло на величину пересульфирования (см. табл. 3).

Таблица 2

Влияние недостаточности витамина В₆ на образование цистеина из гомоцистеина и серина в экстрактах печени крысы

Смешан. корм	В ₆ -ави аминокислотные крысы		
	Синтет. рацион + 100 γ пиридоксина	Синтет. рацион без пиридоксина	Срок авитаминоза в днях
Образование цистеина в γ на 1 г печени			
942	949	293	28
963	1178	348	17
1049	1200	349	24
1060	1986	418	18
1185	2044	418	30
1242	2180	470	27
1297	2341	506	23
1318	—	525	32
1322	—	607	8
Средн. ...1153	1690	437	

Выводы. Активность ферментной системы, образующей цистеин из гомоцистеина и серина, в экстрактах печени крыс снижается на 70—80% при недостаточности витамина В₆ и восстанавливается полностью после 2—3 инъекций пиридоксина. Фосфопиридоксаль (кодекарбоксилаза) восстанавливает активность этой ферментной системы в экстрактах В₆-авитаминозной печени „в пробирке“. Из этих данных следует, что в переносе серы гомоцистеина на серин (пересульфировании) участвует фосфопиридоксальный фермент.

Таблица 3

Активирование процесса пересульфирования в экстрактах В₆-авитаминозной печени фосфопиридоксалем (ФП), кодекарбоксилазой (КД) и пиридоксалем с АТФ „в пробирке“ (образование цистеина в μ г на 1 г ткани печени)

№ п/п	Без добавок	С 10 γ ФП	С КД (\cong 10 γ ФП)	С 300 γ пиридоксала + АТФ	С 300 γ пиридоксина
1	349	837	447	—	—
2	506	1324	1111	—	—
3	293	816	565	—	—
4	470	1116	—	614	468

Институт биологической и медицинской химии Академии медицинских наук СССР

Поступило 14 VII 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Браунштейн, Докл. на II сессии Отдел. медико-биологич. наук АМН СССР, Л., 1949. ² А. Браунштейн и Р. Азарх, ДАН, 71, 93 (1950). ³ M. Speck and D. Pitt, Science, 106, 420 (1947). ⁴ Е. Горяченкова и Р. Азарх, Вопросы медич. химии, 2, в. 1 (1950). ⁵ А. Браунштейн, Биохимия аминокислотного обмена, М., 1949. ⁶ F. Binkley, Journ. Biol. Chem., 155, 39 (1944); Science, 102, 477 (1945). ⁷ W. R. Carroll, G. W. Stacy and V. du Vigneaud, Journ. Biol. Chem., 180, 375 (1949); F. Binkley and D. Okeson, ibid., 182, 273 (1950). ⁸ А. Браунштейн и Е. Горяченкова, Биохимия, 14, 163 (1949). ⁹ B. Riegel and V. du Vigneaud, Journ. Biol. Chem., 112, 149 (1935); J. Stekol, ibid., 140, 827 (1941).