

Е. Ф. ЕФИМОЧКИНА

ВЛИЯНИЕ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ НА СИНТЕЗ ГИППУРОВЫХ КИСЛОТ В ГОМОГЕНИЗИРОВАННОЙ ТКАНИ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

(Представлено академиком Н. Н. Анчиковым 24 VII 1951)

Установлено, что пантотеновая кислота (ПК) в форме «коэнзима А» принимает участие в биологических процессах ацетилирования, а также в образовании активных ацетильных остатков при окислении пировиноградной кислоты и в использовании этих остатков для синтеза лимонной кислоты в «цикле трикарбоновых кислот». А. Е. Браунштейном⁽¹⁾ было выдвинуто представление об участии коэнзима А не только в реакциях энзиматического ацетилирования, но и в более широком круге процессов синтеза кислот-амидных (пептидных) связей^(1, 2). Эта гипотеза нашла подтверждение в данных Браунштейна и автора⁽²⁾ о снижении синтеза гиппуровой кислоты в организме крысы при недостаточности ПК и в работе А. Синицыной⁽³⁾ о нарушении синтеза глутатиона в срезах печени ПК-авитаминозных крыс.

Изложенные ниже опыты имели целью выяснение механизма действия ПК при синтезе гиппуровых кислот.

Экспериментальная часть

Методика. Молодые крысы (начальный вес 40—45 г) содержались на синтетической диете без ПК^(2, 3) до развития явных признаков авитаминоза и ясного снижения прижизненного синтеза гиппуровой кислоты (70—100 дней). Контрольные животные получали в добавление к тому же рациону 150 γ пантотената кальция в день. Печень крыс гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в изотоническом растворе KCl.

Пробы, содержащие по 150 мг гомогенизированной ткани в общем объеме 4 мл, инкубировались для изучения синтеза гиппуровых кислот в течение 1 часа при 38° с качанием в атмосфере кислорода, при следующих конечных концентрациях добавляемых веществ: К-фосфатный буфер — $6 \cdot 10^{-3}$ М (рН = 7,4), бензойная или парааминобензойная кислота 10^{-3} М, глицин 10^{-2} М, MgSO₄ $8 \cdot 10^{-4}$ М, в отдельных пробах: цитохром С $1,2 \cdot 10^{-5}$ М, козимаза 2 мг, фумаровая кислота $2,5 \cdot 10^{-3}$ М, АТФ $2 \cdot 10^{-3}$ М.

Гиппуровая и парааминогиппуровая кислоты определялись при помощи ранее описанных нами методов⁽⁴⁾.

Результаты опытов и обсуждение

Синтез гиппуровой кислоты в гомогенатах печени контрольных крыс, получающих смешанный корм или синтетический рацион с ПК, состав-

ляет в среднем 7 μM на 1 г ткани. У ПК-авитаминозных животных синтез резко снижен: в большинстве случаев образование гиппуровой кислоты вовсе не имеет места, в отдельных опытах оно не превышает 2,5 μM . Результаты части опытов этой серии представлены в табл. 1.

Таблица 1

Синтез гиппуровой кислоты в гомогенатах печени крыс
(в μM на 1 г ткани)
(Условия опыта см. в тексте; кофакторы: фумаровая кислота + цитохром С + козимаза)

№ пп.	Без кофакторов	Кофакторы без АТФ	Кофакторы + АТФ	Кофакторы + АТФ + коэнзим А	Кофакторы + коэнзим А	АТФ без кофакторов
Контрольные крысы (смешанный корм)						
1	6,2	6,8	7,8	8,0	7,8	—
2	9,7	10,7	—	5,8	2,2	—
Контрольные крысы (синтетический рацион + ПК)						
3	1,9	10,0	16,7	—	—	—
4	14,9	13,1	14,9	—	—	4,9
5	5,6	12,3	12,3	—	—	5,8
ПК-авитаминозные крысы						
6	0	1,3	8,7	3,6	1,3	—
7	2,4	2,9	13,8	10,6	0,7	—
8	0,6	0,6	7,4	7,6	0,7	1,5
9	0	1,9	7,0	—	—	—
10	1,3	1,5	4,8	—	—	—

Автором (4) и другими исследователями ранее было показано, что синтез гиппуровой кислоты протекает с использованием энергии лабильных фосфатных связей АТФ. Интенсивность этого синтеза в тканевых гомогенатах при определенных условиях повышается добавлением АТФ и дополнительных веществ («кофакторов»), необходимых для ее ресинтеза, сопряженного с клеточным дыханием, а именно, фумаровой кислоты, цитохрома С, козимазы.

Из табл. 1 видно, что в опытах с гомогенатами печени контрольных крыс добавление фумаровой кислоты, цитохрома С и козимазы (или одной фумаровой кислоты) повышает синтез гиппуровой кислоты, особенно если величины синтеза без кофакторов низки; дополнительное внесение АТФ дает лишь незначительное дальнейшее увеличение синтеза.

В гомогенатах же от ПК-авитаминозных крыс низкие величины синтеза не возрастают в присутствии кофакторов дыхания. Но если, кроме того, добавлена АТФ, то синтез гиппуровой кислоты значительно повышается, приближаясь к величинам синтеза, достигаемым в гомогенатах от контрольных крыс без прибавления АТФ. Интересно, что добавление одной АТФ в отсутствие фумаровой кислоты не увеличивает, а скорее снижает синтез (см. табл. 1, опыты 4, 5 и 8).

В целях выяснения влияния коэнзима ацетилирования на синтез гиппуровой кислоты в гомогенизированной ткани мы добавляли к опытным пробам препараты коэнзима А различной степени очистки (от 12 до 60 единиц в 1 мг Ва-соли по тесту на энзиматическое ацетилирование сульфаниламида (5)), полученные в нашей лаборатории И. С. Севери-

ной. Ва-соль коэнзима переводилась в растворимую калийную соль и прибавлялась в количестве 4—5 единиц на пробу. Из табл. 1 видно, что коэнзим А в этих концентрациях не повышал синтеза гиппуровой кислоты, а иногда и снижал его.

Мы исследовали, далее, влияние недостаточности ПК на синтез парааминогиппуровой кислоты у живых крыс и в опытах с гомогенатами печени. Характерные опыты этой серии представлены в табл. 2. В гомогенатах от контрольных крыс синтез парааминогиппуровой кислоты доходит до 3,5—4,0 $\mu\text{M}/\text{г}$ и почти не повышается добавлением фумаровой кислоты и АТФ. В гомогенате печени ПК-авитаминозных крыс этот процесс снижен почти до нуля. Как и синтез гиппуровой кислоты, он не восстанавливается в присутствии фумаровой кислоты и только добавление АТФ вместе с фумаровой кислотой вызывает значительный синтез парааминогиппуровой кислоты, хотя и уступающий величинам синтеза в гомогенатах от контрольных крыс.

Таблица 2

Синтез парааминогиппуровой кислоты у живых крыс и в гомогенатах печени

Крысы	Выделение парааминогиппур. к-ты с мочой в % от введенной парааминобензойной к-ты	Синтез парааминогиппуровой кислоты в μM на 1 г ткани		
		без кофакторов	с фумаровой к-той	с фумаровой к-той + АТФ
Контрольная, 103 дня на диете с ПК	92,9	3,30	4,00	4,00
ПК-авитаминозная, 93 дня на диете	37,4	0,21	0,13	2,50
ПК-авитаминозная, 81 день на диете	Не опред.	0	0,05	1,90

Ясно выраженное стимулирующее действие АТФ на синтез гиппуровых кислот в гомогенатах печени при недостаточности ПК указывает на то, что при этом авитаминозе понижено содержание высокоэнергетических фосфорных соединений в печени или нарушена регенерация их в гомогенате путем окислительного фосфорилирования.

Нами было проведено определение концентрации неорганического фосфата и фракции лабильных фосфорных соединений (прирост Р после 7-минутного кислотного гидролиза) в печени нормальных и ПК-авитаминозных крыс. Определения проводились методом Фиске — Суббароу в безбелковых фильтратах из кусочков печени, вырезанных у крыс прижизненно при местной новокаиновой анестезии и быстро фиксированных растиранием при 0° в 10% трихлоруксусной кислоте (детали техники см. в работе Г. Тороповой (6)).

Найденные нами концентрации неорганического фосфата в печени лежали в пределах 0,47—0,64 мг P_2O_5 на 1 г ткани у контрольных крыс и в пределах 0,42—0,54 мг P_2O_5 у ПК-авитаминозных. У тех же животных концентрации лабильного («7-минутного») фосфата составляли от 0,34 до 0,47 мг P_2O_5 на 1 г ткани печени в норме и от 0,48 до 0,53 мг P_2O_5 при ПК-авитаминозе.

Таким образом, содержание неорганического и лабильного фосфата в печени оказалось практически одинаковым у контрольных и ПК-авитаминозных крыс и близким к величинам, полученным для нормальных крыс Г. Тороповой (6).

Данные, полученные при этих анализах, дают основание заключить, что снижение синтеза гиппуровых кислот в гомогенатах печени ПК-ави-

таминозных крыс обусловлено не уменьшением концентрации преобразованной АТФ в ткани, а связано, повидимому, с пониженной интенсивностью аэробного ресинтеза распадающихся в гомогенате высокоэнергичных фосфатных связей АТФ. Такое нарушение вполне понятно, если учесть, что при недостаточности ПК резко понижена интенсивность отдельных реакций цикла трикарбоновых кислот, с окислительными процессами которого сопряжено дыхательное фосфорилирование.

Мы не смогли путем добавления коэнзима ацетилирования к гомогенатам печени ПК-авитаминозных крыс выявить постулированную А. Е. Браунштейном функцию этого коэнзима как непосредственного участника реакции образования кислотно-амидной связи при синтезе гиппуровых кислот. Повидимому, это обусловлено тем, что в тканях даже при далеко зашедшем ПК-авитаминозе еще сохраняется около 40—50% нормальной концентрации коэнзима А⁽⁷⁾. Остаточного коэнзима А, очевидно, хватает для обеспечения конденсации ароматических кислот с глицином в присутствии АТФ, хотя его недостаточно для нормального протекания окислительных реакций лимоннокислого цикла и сопряженного фосфорилирования, требующих более высокой концентрации коэнзима А.

В 1951 г. Шантренну⁽⁸⁾ удалось показать прямое участие коэнзима А в энзиматическом бензолировании глицина. Этот автор установил, что в ферментных экстрактах из печени нормальных крыс способность к анаэробному синтезу гиппуровой кислоты в присутствии АТФ исчезает после удаления коэнзима А посредством ионообменного адсорбента и восстанавливается при добавлении этого коэнзима в высоких концентрациях (порядка 40 единиц на 1 мл).

Приношу глубокую благодарность действительному члену АМН СССР проф. А. Е. Браунштейну за руководство работой.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
5 VII 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Браунштейн, Тезисы докладов на II сессии Отдел. медико-биол. наук АМН СССР, 1949, стр. 32. ² А. Браунштейн и Е. Ефимочкина, ДАН, 71, 347 (1950). ³ А. Сяницына, ДАН, 73, 1247 (1950). ⁴ Е. Ефимочкина, Вопросы мед. химии, 1, 227 (1949). ⁵ N. Kaplan and F. Lipmann, Journ. Biol. Chem., 174, 37 (1948). ⁶ Г. Торопова, Биохимия, 7, 32 (1942). ⁷ R. Olson and N. Kaplan, Journ. Biol. Chem., 175, 515 (1948). ⁸ H. Chantrenne, *ibid.*, 189, 227 (1951).