

Е. В. ГОРЯЧЕНКОВА

**ТОРМОЖЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ КИНУРЕНИНАЗЫ
АМИНОКИСЛОТАМИ И ЗНАЧЕНИЕ ЕГО ДЛЯ ПАТОГЕНЕЗА
ПЕЛЛАГРЫ**

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

Общеизвестно, что наиболее частой причиной заболевания пеллагрой является одностороннее питание кукурузой (и некоторыми другими злаками).

Ранние наблюдения Гольдбергера, показавшие связь между возникновением пеллагры у человека и различных животных и недостатком полноценных белков в питании, нашли объяснение в последние годы, когда было установлено, что противопеллагрический витамин — никотиновая кислота — может быть заменен в питании животных достаточными количествами *L*-триптофана. В результате многочисленных работ выяснено, что триптофан в организме животных и человека путем ряда ферментативных превращений переходит в никотиновую кислоту, причем в этом процессе принимает участие витамин В₆ (1-5). Поэтому пеллагра возникает в тех случаях, когда в питании, кроме никотиновой кислоты, одновременно недостает триптофана (или витамина В₆).

Вместе с тем в последнее время получила некоторое подтверждение и так называемая «токсическая теория», связывающая возникновение пеллагры с поступлением в организм токсических веществ, присутствующих в кукурузе (по Вуллей, структурных аналогов и антагонистов никотиновой кислоты). А именно, стало известно, что добавление к пищевому рациону белков, бедных триптофаном (6), например цеина кукурузы, желатины, кислотного гидролизата казеина, или отдельных аминокислот — глицина, треонина, фенилаланина, гистидина, задерживает образование никотиновой кислоты из триптофана в организме (7).

Нами было показано, что ферментативное расщепление кинуренина — главного промежуточного продукта обмена триптофана — ведет к образованию аланина и анраниловой кислоты и что коферментом кинурениназы является фосфопиридоксаль (8). Известно, что одним из ближайших предшественников никотиновой кислоты служит 3-оксианраниловая кислота, тогда как из анраниловой никотиновая кислота у животных не образуется. А. Е. Браунштейн (9) пришел к заключению, что в организме в нормальных условиях расщеплению кинуренина должно предшествовать его окисление в 3-оксикинуренин, расщепляемый кинурениназой с образованием 3-оксианраниловой кислоты. Это заключение вскоре получило полное подтверждение (10, 11).

Наличие в составе кинурениназы фосфопиридоксала, альдегидная группа которого легко конденсируется с различными аминокислотами в шиффовы основания (9, 12), привело нас к мысли, что задержка биосинтеза никотиновой кислоты, вызываемая неполноценными белками, может

объясняться блокированием действия кинурениназы некоторыми аминокислотами.

В настоящей работе приводятся данные опытов, подтверждающих это предположение.

Экспериментальная часть

Постановка опытов. Исследовалось влияние добавленных аминокислот на расщепление *L*-кинуренина при инкубировании с ферментной вытяжкой из печени крыс. Активность кинурениназы измерялась по количеству антраиловой кислоты, образующейся в контрольных (без добавления аминокислот) и опытных пробах. Антраиловая кислота определялась по методу Итагаки и Накаяма (методику и детали постановки опыта см. (8)).

Опытные пробы в общем объеме 4 мл содержали ферментный экстракт из 0,33 г ткани печени, *M*/600 *L*-кинуренинсульфата (2—2,5 мг), *M*/15 фосфатный буфер (рН 7,4) и тщательно нейтрализованные аминокислоты в концентрации *M*/50 (обычное соотношение концентраций аминокислот и кинуренина составляет 12:1, отступления указаны в таблицах). Время инкубации 15—18 час. Наряду с аминокислотами был исследован нейтрализованный кислотный (HCl) гидролизат казеина, добавляемый к пробам с расчетом доведения конечной концентрации свободного аминокислота до *M*/50.

Результаты опытов и обсуждение. В табл. 1 приведены опыты, характеризующие влияние различных концентраций *DL*-серина, *DL*-гистидина и *DL*-аргинина на расщепление кинуренина кинурениназой.

Из табл. 1 видно, что эти аминокислоты уже при концентрации *M*/200 заметно снижают активность кинурениназы, причем с повышением концентрации степень торможения возрастает.

Таблица 1

Торможение действия кинурениназы различными концентрациями серина, гистидина и аргинина (активность кинурениназы выражена в μ М антраиловой кислоты, образуемых экстрактом из 1 г свежей ткани печени)

Концентрация аминокислот в <i>M</i>	Добавленные аминокислоты									
	<i>DL</i> -серин опыт № 1		<i>DL</i> -гистидин				<i>DL</i> -аргинин			
			опыт № 2		опыт № 3		опыт № 2		опыт № 3	
	антран. к-та	торм. %	антран. к-та	торм. %	антран. к-та	торм. %	антран. к-та	торм. %	антран. к-та	торм. %
0 (контроль)	6,3	—	7,1	—	7,0	—	7,1	—	7,0	—
0,005	—	—	5,2	27,1	5,1	27,0	6,6	7,0	6,6	5,7
0,01	5,2	17,2	4,4	38,0	3,6	48,6	6,0	15,6	6,6	5,7
0,02	4,8	24,1	4,0	43,0	3,4	51,4	5,8	18,3	5,7	18,6
0,04	4,0	36,2	—	—	—	—	—	—	—	—

В табл. 2 суммированы результаты большой серии опытов, в которых исследовалось влияние 15 различных аминокислот, хлористого аммония и гидролизата казеина на активность кинурениназы. Оказалось, что ионы аммония, гликоколл, *L*-аспарагин, *L*-аспарагиновая кислота и

Таблица 2

Влияние различных аминокислот на активность кинурениназы печени
 ([кинуренин] = $M/600$, [аминокислоты] = $M/50$; отношение [аминокислоты] : [кинуренин] = 12 : 1)

Добавленные аминокислоты	Число опытов	Торможение кинурениназной реакции в %; средние и крайние (в скобках) величины	Добавленные аминокислоты	Число опытов	Торможение кинурениназной реакции в %; средние и крайние (в скобках) величины
<i>L</i> -глутаминовая кислота	3	1,8 (0—3,0)	<i>DL</i> -треонин	6	26,8 (22,2—30,3)
<i>L</i> -аспарагиновая кислота	2	0	<i>DL</i> -метионин	1	42,1
<i>L</i> -аспарагин	2	0; (17,6 ?)	<i>DL</i> -фенилаланин	2	32,7 (22,4—43,1)
Гликоколл	5	1,1 (0—3,0)	<i>L</i> -лизин	2	25,3 (20,6—30,0)
<i>DL</i> -аланин	8	30,7 (13,2—50,5)	<i>L</i> -аргинин	2	18,5
<i>DL</i> -валин	1	26,0	<i>L</i> -гистидин ($M/50$)	4	58,8 (43,1—73,5)
<i>L</i> -валин	2	26,7 (22,2—31,2)	($M/100$)	2	39,8 (38,5—41,2)
<i>D</i> -валин	2	33,5 (26,4—40,7)	<i>L</i> -пролин	2	40,8 (33,7—47,9)
			<i>L</i> -оксипролин	1	20,6
			Гидролизат казеина ($M/50$ $NH_2 - N$)	1	19,7

L-глутаминовая кислота не влияют на величины расщепления кинуренина. Все остальные аминокислоты вызывали значительное торможение кинурениназной реакции. Привлекает внимание высокое тормозящее действие (от 40 до 73%) метионина, пролина и особенно гистидина. Значительное торможение дают также треонин, фенилаланин, серин, валин, аланин и др. Естественная смесь аминокислот, содержащаяся в гидролизате казеина, в концентрации $M/50$ задерживает расщепление кинуренина ($M/600$) на 20%. Опыты с *D*-, *L*- и *DL*-валином показывают, что тормозящее влияние на кинурениназу свойственно почти в одинаковой мере обоим оптическим изомерам.

Дальнейшие опыты имели целью выяснение вопроса, носит ли торможение кинурениназы конкурентный характер. Опыты были поставлены с *DL*-серином и *L*-гистидином (табл. 3). Они показали, что при добавлении серина величина торможения зависит не от абсолютной концентрации серина, а от отношения концентраций серина и кинуренина. При

Таблица 3

Зависимость активности кинурениназы от соотношения концентрации кинуренина и тормозящих аминокислот (гистидина, серина)

Добавленная аминокислота и ее концентрация	Концентрации кинуренина					
	$M/300$		$M/600$		$M/1200$	
	антран. к-та	торможение %	антран. к-та	торможение %	антран. к-та	торможение %
Контроль	7,5	—	5,9	—	—	—
<i>L</i> -гистидин, $M/200$	4,4	41,8	3,4	42,5	—	—
" $M/100$	3,3	56,4	2,5	57,4	—	—
" $M/50$	2,0	73,5	—	—	—	—
Контроль	—	—	10,0	—	6,8	—
<i>DL</i> -серин, $M/100$	—	—	8,9	11,0	5,8	14,7
" $M/50$	—	—	8,4	16,0	5,3	21,8
" $M/25$	—	—	7,4	26,0	—	—

одном и том же значении этого отношения, например 12 : 1 ($M/25 : M/600$ и $M/50 : M/1200$), степень торможения остается почти одинаковой. Следовательно, торможение в этом случае носит конкурентный характер.

Что касается гистидина, стоящего среди аминокислот на первом месте по интенсивности тормозящего эффекта, то его действие определяется целиком концентрацией самого гистидина. Торможение в этом случае не конкурентное и механизм взаимодействия с ферментом, повидимому, иной. К сожалению, недостаток препарата кинуренина не позволил нам провести исследование характера тормозящего действия других аминокислот.

Таким образом, наши опыты показывают, что многие аминокислоты, которыми богаты неполноценные белки, оказывают тормозящее влияние на то звено в цепи реакций биосинтеза никотиновой кислоты из триптофана, в котором участвует витамин В₆. Пеллагрогенное действие глицина, отмеченное в исследованиях на целостном организме, может быть объяснено общеизвестным превращением его в теле животных в серин, вызывающий значительное торможение кинурениназы в наших условиях опыта.

Оценивая роль исследованного нами явления в регуляции биосинтеза никотиновой кислоты в физиологических условиях, следует учесть, что отношение между концентрациями тормозящих аминокислот и субстратов кинурениназы в тканях организма должно быть значительно более неблагоприятным, чем в наших опытах, и действие тканевой кинурениназы, повидимому, в значительной мере заторможено уже в нормальных условиях питания.

На основании изложенного можно заключить, что пеллагрогенное действие кукурузы и других злаков, очевидно, обусловлено в значительной мере, если не целиком, блокированием ферментативного расщепления одного из предшественников никотиновой кислоты — 3-оксикинуренина — другими аминокислотами, представленными в большом избытке в белках этих злаков, бедных триптофаном ⁽¹²⁾.

Этот вывод заставляет лишний раз со всей определенностью подчеркнуть важность устранения диспропорции между содержанием триптофана и других аминокислот в пищевом рационе как основного условия рациональной профилактики и терапии пеллагры.

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 R. Rosen, J. Huff et al., Journ. Biol. Chem., **163**, 343 (1946). ² S. Singal et al., *ibid.*, **166**, 573 (1946). ³ А. Браунштейн, Биохимия аминокислотного обмена, М., 1949. ⁴ В. Ефремов и С. Каплан, Вопросы питания, **13**, 92 (1951). ⁵ Е. Горяченкова, Сборн. Успехи биол. химии, **2**, М., 1951. ⁶ W. Krehl et al., Journ. Biol. Chem., **166**, 531 (1946); H. Sarett, *ibid.*, **182**, 659 (1950). ⁷ L. Hankes et al., *ibid.*, **174**, 873 (1948); S. Singal et al., *ibid.*, **176**, 1063 (1948). ⁸ А. Браунштейн и Е. Горяченкова, Биохимия, **14**, 163 (1949). ⁹ А. Браунштейн, ДАН, **65**, 715 (1949). ¹⁰ A. Butenandt et al., Naturforschung, **4b**, 242 (1949). ¹¹ O. Wiss, Experientia, **6**, 472 (1950). ¹² А. Браунштейн, Укр. биохим. журн., **22**, 273 (1950).