

Е. Ф. ЕФИМОЧКИНА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ 4,4'-ДИАМИНООРНИТУРОВОЙ И 4,4'-ДИАМИНОЛИЗУРОВОЙ КИСЛОТ

(Представлено академиком А. Д. Сперанским 22 VIII 1951)

Изучение биологического синтеза парных соединений орнитина у птиц является дальнейшим развитием наших исследований о биологическом синтезе соединений с кислотнo-амидной связью — гиппуровой, парааминогиппуровой и фенацетуровой кислот (¹⁻³). Данные литературы о реакциях «обезвреживания» ароматических кислот в организме птиц ограничиваются работами Яффе, открывшего в 1877 г. синтез орнитуровой кислоты, Тотани (1910), констатировавшего синтез дифенилацетилорнитина, и несколькими работами о влиянии ароматических кислот на белковый обмен у птиц (⁴). Количественная сторона процесса и его механизм не были изучены.

По методическим соображениям мы остановились на изучении синтеза парных соединений орнитина и парааминобензойной кислоты (ПАБ) у птиц, ранее никем не исследованного. Когда заканчивались наши опыты, было опубликовано сообщение Мак-Гильвери и Когена (⁵) о синтезе орнитуровых кислот из ПАБ и α - или δ -бензоилорнитина в гомогенатах почек курицы.

Ниже изложены полученные нами данные об образовании α , δ -аминобензоилорнитина, или 4,4'-диаминоорнитуровой кислоты (ДАО), из ПАБ в организме голубя и курицы, а также в гомогенатах почек кур. Кроме того, нам удалось обнаружить биологический синтез лизинового аналога этого соединения, а именно α , ϵ -диаминобензоиллизина или 4,4'-диаминолизуровой кислоты (ДАЛ). Это — первый случай обнаружения специальной функции лизина в процессах обмена веществ, помимо участия его в построении белковой молекулы.

Экспериментальная часть

Методика. Исследования проводились на цыплятах породы Белый леггорн, возрастом от 10 до 80 дней, и на взрослых голубях; птицы получали обычный смешанный корм. При опытах на живых птицах ПАБ в нейтральном растворе вводилась в зоб из пипетки. Одновременно к рациону птиц добавляли желатину (1—4 г) в качестве дополнительного источника орнитина. Помет птиц собирали количественно в течение 24 час. после нагрузки ПАБ (на вторые сутки после нагрузки помет не содержал ПАБ и ее соединений). Помет дважды экстрагировали 5-кратным объемом кипящего 70% спирта; вытяжку отфильтровывали, сгущали в вакууме до удаления спирта, доводили до 500—1000 мл дистиллированной водой и после вторичного фильтрования использовали для определения свободной и связанной ПАБ (см. ниже).

В опытах с тканевыми гомогенатами пробы, содержащие в общем объеме 4 мл от 150 до 300 мг свежей ткани, гомогенизированной в изотоническом растворе KCl, инкубировали 1 час при 38° с качанием в атмосфере O₂. Конечные концентрации веществ в пробах: KCl — изотонический раствор, К-фосфатный буфер (рН 7,4) $6 \cdot 10^{-3}$ М; MgSO₄ $8 \cdot 10^{-4}$ М; К-фумарат $2,5 \cdot 10^{-3}$ М; ПАБ $2 \cdot 10^{-3}$ М; DL-орнитин-HCl 10^{-2} М; АТФ $2 \cdot 10^{-3}$ М; в отдельных пробах: цитохром С $1,2 \cdot 10^{-5}$ М; козимаза 2 мг. В некоторых пробах орнитин заменялся следующими аминокислотами: L-аргинин-HCl, DL-цитруллин-HCl или DL-лизин-HCl 10^{-2} М, δ-бензоил-DL-орнитин $5 \cdot 10^{-3}$ М.

Для анализа на общую и связанную (не извлекаемую эфиром) ПАБ брали трихлоруксусный фильтрат опытных проб или разведенную вытяжку помета в количестве, содержащем от 5 до 45 мкг ПАБ. Определение производилось в ступенчатом фотометре по интенсивности окраски азокрасителя, полученного путем диазотирования раствора и последующего сочетания с 8-оксихинолином (1, 7). Техника разделения свободной ПАБ и связанной в виде ДАО или ДАЛ аналогична описанному ранее разделению ПАБ и парааминогиппуровой кислоты (1, 5, 6). В экстрактах помета птиц определялся также прирост диазотируемой ПАБ после 2-часового гидролиза с HCl. Эта фракция ПАБ, выделяемая с пометом в виде парного соединения с замещенной ароматической аминогруппой, по аналогии с данными, полученными на млекопитающих, обозначается нами как ацетилированная ПАБ.

ПАБ, добавленная к тканям или помету птиц, открывается по этому методу количественно. При определении ДАО и ДАЛ мы не вносили поправки на незначительную растворимость этих связанных форм ПАБ в эфире. Помет птиц, не получавших ПАБ, не содержал веществ, определяемых как свободная или связанная ПАБ.

Результаты опытов. В первой серии опытов исследовалось образование парных соединений ПАБ в организме живых птиц. Из табл. 1 видно, что птицы после нагрузки выделяют в свободном или связанном виде только часть введенной ПАБ (32—59% у цыплят, 23—38% у голубей); остальная ПАБ в организме окисляется или превращается в продукты, не обнаруживаемые в помете в виде азокрасителей.

У голубей величины общей ПАБ в вытяжке из помета нарастают после гидролиза с HCl. Фракция ПАБ с замещенной аминогруппой, по всей вероятности, представляет N-ацетил-парааминобензойную кислоту. У голубей на ее долю приходится 8—14% от введенной ПАБ (или 35—37% от общей выделенной ПАБ). У цыплят эта фракция отсутствует или весьма незначительна. В виде эфиронерастворимого парного соединения с диазотируемой аминогруппой у цыплят выводится 20—32% введенной ПАБ (40—70% от выделенной), у голубей 12,5—18% введенной или несколько больше половины выведенной ПАБ. Последующие опыты с переживающими тканями и исследование посредством распределительной хроматографии показали, что эта фракция состоит преимущественно из ДАО.

В дальнейших опытах было изучено образование ДАО в тканевых срезах и гомогенатах. В опытах с тканями голубя не удалось обнаружить синтеза ДАО из орнитина и ПАБ ни в гомогенатах, ни в срезах печени и почек, ни в слизистой тонких кишок. Опыты с тканями цыплят показали, что в гомогенатах почек цыпленка при аэробном инкубировании в описанных выше условиях образуется ДАО в количестве от 1,5 до 3,0 мМ на 1 г ткани. Часть опытов этой серии представлена в табл. 2. Оптимальные величины синтеза достигаются при добавлении фумарата и АТФ. Гомогенаты печени цыплят в тех же условиях опыта не синтезируют ДАО.

Изложенные результаты опытов с переживающими тканями совпадают с данными Мак-Гильвери и Когена (5).

Таблица 1

Синтез 4,4'-диаминоорнитуровой кислоты (ДАО)
в организме цыплят и голубей

| Число птиц, получивших нагрузку ПАБ | Всего введено ПАБ в мг | Найдено ПАБ в помете в мг | | | |
|--|---------------------------|---------------------------|---|--|-----------|
| | | всего после гидролиза | связанной эф- фиронераствори- мой (ДАО) | связанной неди- азотируемой (ацетил-ПАБ) | свободной |
| Цыплята | | | | | |
| 2 | 50 | 29,4 | 16,0 | 0 | 13,4 |
| 2 | 50 | 23,4 | 10,4 | 0 | 13,0 |
| 4 | 100 | 39,0 | 21,0 | 0 | 18,0 |
| 2 | 50 | 16,5 | 11,3 | 2,1 | 3,1 |
| 4 | 120 | 40,0 | 24,0 | 0 | 16,0 |
| Голуби | | | | | |
| 1 | 200 | 45,4 | 24,8 | 16,1 | 5,3 |
| 1 | 200 | 75,8 | 37,8 | 28,3 | 9,7 |

Дальнейшие опыты были направлены на выяснение возможности замены орнитина при синтезе парных соединений ПАБ его предшественниками или другими аминокислотами. При добавлении к гомогенату почек цыпленка *DL*-пролина или *L*-глутаминовой кислоты вместо орнитина синтеза ДАО не наблюдалось (в организме млекопитающих эти аминокислоты, как известно, переходят в орнитин⁽⁴⁾).

Из табл. 3 видно, что образование парных соединений ПАБ имело место при добавлении к гомогенату *L*-аргинина, *DL*-цитруллина, δ -бензоил-*DL*-орнитина или *DL*-лизина. Аргинин расщепляется аргиназой почек с образованием орнитина. Цитруллин также, повидимому, служит косвенным источником орнитина после предварительного превращения в аргинин⁽⁴⁾; малые величины синтеза ДАО из цитруллина указывают на недостаточную скорость этого превращения. Из δ -бензоилорнитина путем присоединения ПАБ в α -положении образуется орнитуровая кислота со смешанными функциями — δ -бензоил- α -аминобензоилорнитин⁽⁵⁾.

Наиболее интересными и несколько неожиданными оказались результаты опытов с лизином. В этих опытах во всех случаях наблюдалось образование парного соединения ПАБ, аналогичного по свойствам ДАО, но, очевидно, не идентичного ей. Естественно было предположить, что здесь имеет место энзиматический синтез аналога орнитуровых кислот, а именно α , ϵ -диаминобензоиллизина, или 4,4'-диаминолизуровой кислоты (ДАЛ). Это соединение и его свойства до сих пор не описаны (незамещенная лизуровая кислота синтезирована химически).

В исследовании, детали которого будут сообщены отдельно, нами было показано методом распределительной хроматографии, что обнару-

Таблица 2
Синтез диаминоорнитуровой кислоты (ДАО) в гомогенизированной ткани почек цыплят (условия опыта см. в тексте)

| Количество ткани по- чек в пробе в мг | Образовалось ДАО на 1 г ткани | |
|--|----------------------------------|------|
| | мг ПАБ | цМ |
| 250 | 252,0 | 1,84 |
| 250 | 285,5 | 2,08 |
| 240 | 265,4 | 1,94 |
| 300 | 325,0 | 2,37 |
| 188 | 299,4 | 2,19 |
| 166 | 311,5 | 2,64 |
| 150 | 400,0 | 2,92 |
| 157 | 238,0 | 1,74 |
| 271 | 373,4 | 2,73 |

Таблица 3

Синтез диаминоорнитуровой и диаминолизуровой кислот в гомогенизированной ткани почек цыплят (в $\mu\text{г}$ на 1 г ткани)

| DL-орнитин | L-аргинин | DL-цитруллин | δ -бензоил-DL-орнитин | DL-лизин |
|------------|-----------|--------------|------------------------------|----------|
| 299,5 | 380,3 | 139,9 | 259,6 | 139,9 |
| 393,5 | — | 150,0 | — | 150,0 |
| 341,4 | 343,4 | — | — | — |
| 285,2 | — | — | 240,0 | — |
| 400,0 | — | — | — | 150,0 |
| 232,5 | — | — | — | 262,4 |
| 373,4 | — | — | — | 202,9 |

женное нами соединение представляет парное соединение лизина с ПАБ, которую замещены обе аминокислоты лизина. Наличие L-лизина в продуктах гидролиза вещества, выделенного нами из опытных проб с тканью почек цыпленка, было подтверждено при помощи бактериальной L-лизин-декарбоксилазы (в лаборатории проф. С. Р. Мардашева). В предварительных опытах нами обнаружено, что и в теле живого цыпленка из ПАБ образуется ДАЛ наряду с ДАО.

Исследование образования лизуровых и орнитуровых кислот в организме птиц нами продолжается.

Выводы

1. В организме птиц ПАБ частично превращается в диаминоорнитуровую кислоту (у цыплят и голубей) и в связанное недиазотируемое производное, повидимому, ацетил-ПАБ (у голубей); значительная часть введенной ПАБ (40—75%) в помете птиц не обнаруживается.

2. При аэробных условиях в гомогенатах почек цыплят из ПАБ и орнитина синтезируется 4,4'-диаминоорнитуровая кислота (ДАО). В гомогенатах печени цыпленка и тканей голубя (печени, почек, кишечной слизи) ДАО в тех же условиях не синтезируется.

3. Синтез ДАО в гомогенатах почек цыпленка протекает с такой же интенсивностью при добавлении аргинина вместо орнитина; при замене последнего цитруллином или δ -бензоилорнитинном аминокислотные кислоты синтезируются в меньшем количестве.

4. Впервые обнаружен синтез 4,4'-диаминолизуровой кислоты (ДАЛ) из ПАБ и лизина в гомогенате почек цыплят; интенсивность этого процесса, как правило, меньше интенсивности синтеза ДАО. Синтез ДАЛ у кур имеет место и в живом организме.

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

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
22 VIII 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Е. Ефимочкина, Вопросы медич. химии, 1, 227 (1949). ² А. Браунштейн и Е. Ефимочкина, ДАН, 71, 347 (1950). ³ Е. Ефимочкина, ДАН, 80, № 3 (1951). ⁴ А. Браунштейн, Биохимия аминокислотного обмена, М., 1949. ⁵ R. McGilvery and P. Cohen, Journ. Biol. Chem., 183, 179 (1950). ⁶ P. Cohen and R. McGilvery, *ibid.*, 166, 261 (1946). ⁷ В. Пребстинг и Н. Гаврилов, Лаб. практика, № 12, 30 (1939).