

Т. Т. БЕРЕЗОВ

РОЛЬ ВИТАМИНА В₆ В ОБМЕНЕ L- и D-АМИНОКИСЛОТ В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ

ВЛИЯНИЕ В₆-АВИТАМИНОЗА НА ПРИЖИЗНЕННЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ L- и D-ФЕНИЛАЛАНИНА У КРЫС

(Представлено академиком А. И. Опариным 14 VII 1952)

Впервые А. Е. Браунштейном совместно с С. М. Бычковым (1) и с Р. М. Азарх (2) было показано, что окислительное дезаминирование ряда L-аминокислот происходит в тканях животных непрямым путем, посредством переаминирования с α -кетоглутаровой кислотой и последующего дезаминирования образующейся глутаминовой кислоты. Эта точка зрения подтверждается рядом авторов, изучивших обмен L-аланина (3), L-аспарагиновой кислоты (4) и L-тирозина (5) в переживающих тканях; то же относится, очевидно, к дезаминированию продуктов распада L-триптофана (6, 7). В организме животных при распаде всех L-аминокислот азот переходит, в основном, в мочевины, причем 50% азота мочевины имеет источником L-аспарагиновую кислоту (8), в которую азот остальных аминокислот может переходить путем переаминирования, минуя освобождение в форме NH₃ (2, 9).

Представление о непрямом пути синтеза L-аминокислот из NH₃ и α -кетокислот посредством аминирования -кетоглутаровой или щавелевоуксусной кислоты и последующего переаминирования (9, 10) впервые было экспериментально обосновано М. Г. Крицман (11). Снелл и сотр. (12) показали, что переаминирование представляет единственный путь синтеза монокарбоновых аминокислот из кетокислот у молочнокислых бактерий. Возможность замещения ряда незаменимых L-аминокислот в питании животных их D-изомерами определяется тем, что последние подвергаются прямому дезаминированию (оксидазой D-аминокислот) в α -кетокислоты, из которых далее синтезируются L-аминокислоты (9).

Ферменты переаминирования являются пиридоксальпротеидами; поэтому те процессы образования и распада L-аминокислот, которые протекают с их участием, должны быть нарушены при В₆-авитаминозе. Результаты исследований о влиянии В₆-авитаминоза на обмен L- и D-аминокислот в организме крысы, проведенных нами под руководством проф. А. Е. Браунштейна, хорошо согласуются с изложенными представлениями о не прямых путях распада и синтеза ряда L-аминокислот.

В настоящем сообщении изложены данные наших опытов по обмену L- и D-фенилаланина (L- и D-ФА).

Экспериментальная часть

Методика. Опыты проводились на 4 молодых крысах с выраженным В₆-авитаминозом и 4 контрольных крысах. В течение всего периода исследования крысы находились на «спаренном» кормлении (состав рациона см. (7)). После нескольких предварительных анализов мочи

крысы получали рег ос, с интервалами по 2—3 дня, попеременные нагрузки *L*-ФА и *D*-ФА, всего по 2—3 нагрузки на крысу.

В моче, собранной за сутки до или после нагрузок, определялось содержание общего N (Кьельдаль), N мочевины (уреазой), N аммиака (Конвей), amino-N и пептидного N (фотометрически с реактивом Фолина); «не определяемый» N вычислялся по разности между общим N и суммой анализируемых фракций N.

Определялись также продукты неполного распада ФА: сумма α -кетокислот (по Лю), фенилпировиноградная кислота (фенил-ПВ, фотометрией реакции с Fe^{+++}), фенолокислоты («тирозин», методом Арнау с миллоновым реактивом) и «гомогентизиновая кислота» (методом Бриггса; этим не вполне специфичным методом в наших опытах определялась преимущественно *n*-оксифенилпировиноградная кислота; настоящую гомогентизиновую кислоту, дающую «алкаптоновую пробу», выделяла только одна B_6 -авитаминозная крыса после дачи *L*-ФА). Сумма фенил-ПВ «тирозина» и «гомогентизиновой к-ты», в микромолях характеризует минимальную величину экскреции продуктов неполного распада ФА, сохранивших ароматическое ядро.

В целях экономии места данные всех опытов, хорошо согласующиеся, приведены в табл. 1 в виде средних величин, хотя по существу при малом числе опытов вычисление средних не оправдано.

Результаты опытов и обсуждение. Распределение фракций N в моче контрольных крыс (табл. 1) согласуется с литературными данными. Введение *L*- и *D*-ФА (3 и 6 мМ) не вызывает сдвигов в распределении N или заметного прироста N аммиака, amino-N и N пептидов; при малой нагрузке (3 мМ) почти весь азот *L*- и *D*-ФА выводится в форме мочевины; при нагрузках по 6 мМ выражена тенденция к задержке N (возможно — в силу токсичности этих доз ФА). После дачи *L*-ФА с мочей выводятся небольшие количества α -кетокислот (преимущественно фенил-ПВ) и продуктов, дающих реакции Миллона и Бриггса (см. выше); в виде недоокисленных ароматических продуктов выводится 1,5—2,7% *L*-ФА. После нагрузки *D*-ФА выделяется в 7 раз больше фенил-ПВ, в 2 раза больше «гомогентизиновой» и, примерно, в 3 раза больше суммарных ароматических продуктов, чем после дачи *L*-ФА. N мочевины во всех опытах на контрольных крысах составляет от 78 до 84% общего N, а «не определяемый» N — от 5,3 до 10,6% (табл. 1).

Основные изменения, наблюдаемые при B_6 -авитаминозе, следующие. Без нагрузки у всех B_6 -авитаминозных крыс значительно снижен N мочевины (до 54% в среднем) и соответственно повышен «не определяемый» N (с 9 до 36%); величины N аммиака, amino- и пептидного N — в пределах нормы. Уже при даче 3 мМ *L*- или *D*-ФА отмечается задержка азота, а при дозах 6 мМ общий N мочи нередко бывает ниже, чем до нагрузки (проявление повышенной токсичности ФА при авитаминозе).

Введение ФА (особенно *D*-ФА) вызывает небольшой прирост пептидного и amino-N), более заметный при дозе 6 мМ, при которой слегка повышен также N аммиака. Нагрузка *L*-ФА вызывает сильное дальнейшее снижение мочевины как абсолютное, так и относительное (до 35,2 и 40%) и соответствующий прирост «не определяемого» N (до 54,1 и 41,7%). Напротив, при даче *D*-ФА выделение мочевины B_6 -авитаминозными крысами резко повышается (до 71,4 и 61,0%); одновременно круто снижается фракция «не определяемого» N (до 16—17%).

По сравнению с контрольными крысами сумма ароматических продуктов повышена в 3,5—4 раза при даче *L*-ФА, преимущественно за счет фенолокислот («гомогентизиновой» и «тирозина») и незначительно повышена при даче *D*-ФА, при которой резкое увеличение экскреции фенил-ПВ компенсировано пониженным выделением гидроксилированных ароматических продуктов.

Таблица 1

Продукты азотистого обмена в суточной моче нормальных и V_6 -авитаминозных крыс

(средние величины, крысы на спаренном кормлении)

Нагрузка	Число крыс	Общее число опытов	Количество N в мг (первая строка) и распределение N в % от общ. N (вторая строка)						Продукты обмена фенилаланина в микромолях						
			Общий N	N мочевины	N аммиака	N — NH ₃	N пептидный	„не определяемый“ N	α -кетокислоты (общ.)	Фенил-ПВ	„Тирозин“	„Гомоентизин“ к-та*	Σ ароматич. продуктов		
													в ммол.	в % от введенного	
Нормальные крысы															
Без нагрузки	4	10	250	198	19,2	2,5	9,0	23,8							
			100	80	7,7	1,0	3,6	9,0							
0,50 г L-ФА (3 мМ=42 мг N)	2	3	286	233	20,8	3,1	13,8	18,4	11	10	44	27	81	2,7	
			100	81,4	7,3	1,1	4,8	6,5							
1,00 г L-ФА (6 мМ=84 мг N)	2	2	260	203	20,7	3,0	8,7	27,6	35	20	36	30	86	1,5	
			100	78,0	8,0	1,1	3,4	10,6							
0,50 г D-ФА (3 мМ=42 мг N)	2	2	313	260	22,0	4,3	12,5	18,5	84	62	46	75	183	6,1	
			100	83,7	7,0	1,4	4,0	5,3							
1,00 г D-ФА (6 мМ=84 мг N)	2	2	267	202	22,6	4,6	13,0	29,5	266	233	38	58	329	5,5	
			100	78,3	8,5	1,7	4,9	8,3							

 V_6 -авитаминозные крысы

Без нагрузки	4	9	214	116	12,5	3,3	10,5	75,0						
			100	54,2	5,1	1,5	5,0	35,7						
0,50 г L-ФА (3 мМ=42 мг N)	2	2	238	84	12,9	6,5	12,6	128,5	28	17	83	191	291	9,7
			100	35,2	5,4	2,7	5,3	54,1						
1,00 L-ФА (6 мМ=84 мг N)	2	2	179	72	17,2	5,2	15,7	74,0	99	67	152	156	375	6,2
			100	40,0	9,6	3,0	8,7	41,7						
0,50 г D-ФА (3 мМ=42 мг N)	2	2	227	162	11,7	7,0	16,4	27,0	137	117	23	47	187	6,2
			100	71,4	5,2	3,1	7,2	16,2						
1,00 г D-ФА (6 мМ=84 мг N)	2	2	190	116	23,9	7,3	18,0	32,0	387	354	23	35	412	6,7
			100	61,0	12,6	3,8	9,5	16,9						

То же, после 4 дней лечения пиридоксимом (100 γ в день)

0,50 г L-ФА	1	1	287	230	16,0	7,9	24,1	17,0	17	13	21	9	43	1,4
			100	80,0	5,5	2,8	8,4	6,1						
0,50 г D-ФА	1	1	255	182	17,6	7,7	14,0	41,4	189	159	26	25	167	5,6
			100	71,4	7,4	3,0	5,9	15,3						

После лечения авитаминозных крыс инъекциями пиридоксина (4 \times 100 γ) все показатели обмена L- и D-ФА (и пищевого белка) почти полностью возвращаются к норме.

Изложенные результаты могут быть поняты, если мы примем, что распад L-ФА и его образование из фенил-ПВ в организме крысы протекает путем переаминирования.

При V_6 -авитаминозе введенный крысам D-ФА беспрепятственно дезаминируется оксидазой D-аминокислот, и образующийся NH₃, после

частичного перехода в аспарагиновую кислоту, превращается в мочевину (ср. ^{8, 9}); по нашим данным, о которых будет сообщено отдельно, образование мочевины из NH_3 и из *L*-аспарагиновой кислоты при V_6 -авитаминозе не нарушается). Вследствие снижения активности аминотрансфераз образование *L*-ФА из фенил-ПВ у V_6 -авитаминозных крыс нарушено, и они после приема *D*-ФА выводят α -кетокислоту в повышенном количестве*.

Переход значительной части азота белка, и в еще большей мере — азота *L*-ФА, в мочевину задержан при V_6 -авитаминозе, очевидно, в результате нарушения промежуточного переноса NH_2 -групп на *L*-аспарагиновую кислоту. Хотя экскреция amino- и пептидного N при V_6 -авитаминозе не повышена, уменьшенное мочевинообразование свидетельствует о том, что *L*-ФА и значительная часть пищевых аминокислот не подвергаются в теле крысы прямому дезаминированию, так как в противном случае образующийся NH_3 выделялся бы в виде мочевины (см. выше). Задержка непрямого дезаминирования *L*-ФА и *L*-тирозина и реаминирования *p*-оксифенил-ПВ при V_6 -авитаминозе проявляется также в повышенной экскреции фракции «тирозина» и «гемогентизиновой кислоты» после дачи *L*-ФА.

Нарушения обмена amino- и кетокислот у V_6 -авитаминозных крыс остаются в большой мере компенсированными благодаря остаточной активности пиридоксалевого энзимов, в том числе — аминотрансфераз. С учетом этого обстоятельства, полученные нами результаты можно рассматривать как подтверждение, на живом животном, роли «непрямых» механизмов (с участием аминотрансфераз) в дезаминировании и синтезе *L*-ФА и в превращении его азота в мочевину. Особый интерес представляет превращение у V_6 -авитаминозных крыс существенной доли азота белка и, особенно, *L*-ФА (но не *D*-ФА) в неизвестные азотистые соединения «не определяемой» фракции; выяснение природы этих соединений представляет важную задачу будущих исследований.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
8 VII 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Е. Браунштейн, С. М. Бычков, Биохимия, 5, 267 (1939).
² А. Е. Браунштейн, Р. М. Азарх, там же, 9, 337 (1944). ³ J. Still et al., Arch. Biochem., 26, 413 (1950). ⁴ H. Nakada, S. Weinhouse, J. biol. Chem., 187, 663 (1950). ⁵ W. Кнох, M. Le May-Кнох, Biochem. J., 49, 586 (1951).
⁶ С. Dalglish, M. Кнох, A. Neuberger, Nature, 168, 20 (1951).
⁷ А. Браунштейн, Е. Горяченкова, Биохимия, 14, 163 (1949). ⁸ S. Rappaport, A. Pappas, J. biol. Chem., 179, 1183, 1199 (1949). ⁹ А. Браунштейн, Биохимия аминокислотного обмена, М., 1949; А. Браунштейн, М. Крицман, Биохимия, 2, 859 (1937). ¹⁰ H. V. Euler et al., Z. physiol. Chem., 254, 61 (1938).
¹¹ М. Крицман, Биохимия, 9, 379 (1944); М. Крицман, С. Мелик-Саркисян, там же, 10, 1, 336 (1945). ¹² J. Holden, R. Wildman, E. Snell, J. biol. Chem., 191, 559 (1951).

* Нарушение инверсии введенного *D*-ФА в V_6 -авитаминозном организме проявляется также в значительно меньшем, чем у контрольных крыс (или у авитаминозных после дачи *L*-ФА), выделении фенолокислот и «гемогентизиновой к-ты» (точнее — *p*-оксифенил-ПВ). Как известно, у животных бензольное ядро окисляется в фенольное только в *L*-ФА, но не в *D*-ФА или фенил-ПВ (⁹).