

Т. Т. БЕРЕЗОВ

ВЛИЯНИЕ В₆-АВИТАМИНОЗА НА ПРИЖИЗНЕННЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ L- И D-ТРИПТОФАНА

(Представлено академиком А. И. Опариным 23 III 1953)

В предыдущем сообщении (1) нами рассмотрены теоретические предпосылки использования В₆-авитаминоза как экспериментальной модели для изучения роли реакций переаминирования в процессах синтеза L-аминокислот из α -кетокислот, их дезаминирования и превращения в мочевины в организме животных *in vivo*. В опытах на нормальных и В₆-авитаминозных крысах нами было подтверждено значение не прямых механизмов с участием переаминирования в диссимиляции азота L-фенилаланина и в образовании этой аминокислоты при биологической инверсии ее D-изомера в организме крысы (1).

В настоящей работе описаны аналогичные опыты с L- и D-триптофаном (L-ТФ и D-ТФ), показавшие, что при обмене этой аминокислоты в организме крысы действуют те же закономерности. Они осложнены в данном случае тем, что диссимиляция половины азота ТФ (азота индолового ядра) протекает особыми, еще не полностью изученными путями. Кроме того, непосредственный перенос NH₂-группы L-ТФ в реакциях переаминирования, недавно доказанный в опытах с тканевыми гомогенатами (2), играет в организме подчиненную роль по сравнению с процессами окислительной диссимиляции L-ТФ. При последней боковая цепь L-ТФ через кинуренин и 3-оксикинуренин переходит в L-аланин, дальнейшие превращения которого определяют судьбу NH₂-группы основной массы L-ТФ в теле животного. Отщепление аланина от кинуренинов протекает при участии пиридоксалевого энзима, кинурениназы, и в свою очередь нарушается при недостаточности витамина В₆, что приводит к накоплению и экскреции ряда промежуточных продуктов обмена L-ТФ при этом авитаминозе (3-6).

Снижением активности кинурениназы и аминофераз могут быть объяснены все основные изменения обмена L- и D-триптофана при недостаточности витамина В₆.

Экспериментальная часть

Постановка и результаты опытов. Для опытов служили 4 В₆-авитаминозных и 4 контрольных крысы, находившиеся на спаренном кормлении; после нескольких предварительных анализов мочи крысы получали *reg os* попеременные нагрузки L-ТФ и D-ТФ в дозах от 1,7 до 4 ммол (ср. (1)). В суточных порциях мочи до и после нагрузок определяли фракции N и α -кетокислоты (1), а также триптофан (по Шоу и Макфарлен), кинуренин (по Отани и Нишино (3)) и ксантуреновую кислоту (фотометрией реакции с Fe (7); ввиду отсутствия препарата ксантуреновой кислоты для калибровки метода, в таблицах приведены относительные величины в виде отсчетов абсорбциометра Спеккера).

Кроме того, содержание в моче ТФ и его циклических метаболитов исследовалось путем хроматографии на бумаге. Растворитель (бутанол:вода:уксусная кислота в отношении 5:4:1) пропускался через бумагу в нисходящем направлении 18—24 час. (на вытекание).

Метаболиты ТФ обнаруживались по положению на бумаге (и цвету) пятен, флуоресцирующих при освещении ультрафиолетовыми лучами (ультрахеомоскопом Брумберга), а также дающих окраску с нингидрином (ТФ, кинуренин) или с диметиламинобензальдегидом (кинуренин, окскинуренин, антралиловая кислота) (см. рис. 1).

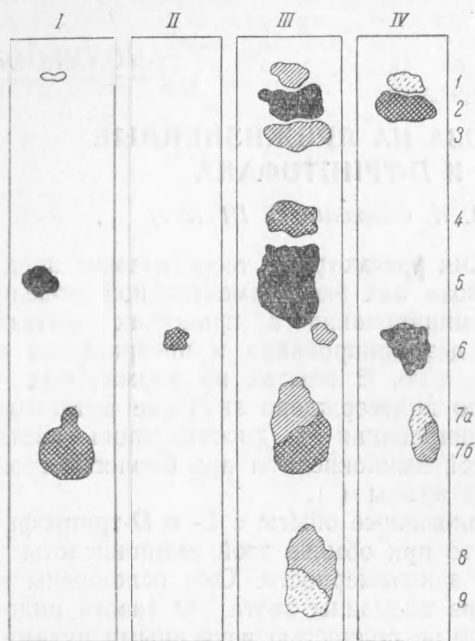


Рис. 1. Хроматограммы мочи крыс после нагрузки *L*- и *D*-триптофаном (схематическое изображение). На рисунке показаны размеры и положение пятен метаболитов триптофана, флуоресцирующих в ультрафиолете. Густотой штриховки условно обозначена интенсивность флуоресценции. Пятна 1, 2, 3 — производные кинуренина и 3-окскинуренина (6); 4 — 3-окскинуренин (6); 5 — кинуренин; 6 — триптофан; 7а — ксантуреновая кислота (6) (флуоресценция бледно-голубая); 7б — кинуреновая кислота (флуоресценция синяя); 8 и 9 — ацетилпроизводные кинуренина и 3-окскинуренина (6). Пятна 5, 6, 7б идентифицированы по эталонным хроматограммам соответствующих веществ, остальные пятна — по их относительным скоростям движения, путем сопоставления с хроматограммами Дэлглиша и сотр. (6), полученными в таких же условиях. I — контроль *L*-ТФ; II — контроль, *D*-ТФ; III — B_6 -авитаминоз, *L*-ТФ; IV — B_6 -авитаминоз, *D*-ТФ

Результаты анализов (в виде средних величин) приведены в табл. 1. Сдвиги в распределении фракций азота в моче (до нагрузок) при B_6 -авитаминозе характеризуются, как и в предыдущих наших опытах (1), уменьшением N мочевины (с 81,8 до 63,6% в среднем) и соответствующим приростом «не определяемой» фракции N (с 8,4 до 20,6%), без изменений в количестве N аммиака, аминокислот и пептидов.

При нагрузках *L*-ТФ (3 и 4 мМ) молодые крысы, получающие полноценное питание (контрольные), в соответствии с литературными данными, удерживают значительную часть азота ТФ. При дозе 4 мМ с мочой выводится лишь около 22% азота *L*-ТФ, почти целиком в виде мочевины. В моче появляются следы ТФ, α -кетокислоты и кинуренина. На хроматограммах такой мочи (рис. 1) видны небольшие пятна кинуренина и кинуреновой кислоты. При нагрузках *D*-ТФ контрольные крысы также задерживают много азота, но выделяемая с мочой доля N *L*-ТФ доходит (при дозе 4 мМ) до 39% (в том числе в виде мочевины 35,7%, аммиака 2,6%, N аминокислот и пептидов 6,4%).

Моча содержит заметные количества неизмененного *D*-ТФ, кетокислоты (индол-ПВ) и дает слабую окраску на «кинуренин» с нетипичной (коричневой) окраской. На хроматограммах обнаруживается только ТФ, кинуренин и кинуреновая кислота отсутствуют. Распределение N по фракциям мочи у контрольных крыс, получивших *L*- или *D*-ТФ, не изменяется, если не считать незначительного прироста N NH_2 за счет экскреции неизмененного *D*-ТФ.

У B_6 -авитаминозных крыс при нагрузках *L*-ТФ (1,7 и 4 мМ) задержка азота эквивалентна всему азоту ТФ; абсолютное и относительное содержание мочевины и других фракций N в моче остается тем же, что и до нагрузки. Моча содержит следы ТФ и α -кетокислоты, а также значительные количества кинуренина (10—12% теории) и ксантуреновой кислоты. На хроматограммах (рис. 1) видно, что в моче появляется

Таблица 1

Продукты азотистого обмена в суточной моче крыс
(средние величины; рацион с 40% содержанием белка)

Нагрузки	Число крыс	Общее число опытов	Колич. азота в мг (первая строка) и распределение N в % к общ. N (вторая строка)						Метаболиты ТР			
			общий N	N мочевины	N NH ₃	N NH ₂	N NH ₂ пептиды	N не определяем. N	в μ мол.			в долях абс. сорбиметра. Ксантуреновая к-та
									ТФ	α -кетокислоты	кинурины	

I. Контрольные крысы

Без нагрузки	4	14	191	156	14	2,7	3,4	15	0	0	0	0
			100	81,8	6,7	1,4	1,8	8,4				
0,61 г L-ТФ (3 мМ=84 мг N= =42 мг N NH ₂)	1	1	197	162	10	6,2	4,5	14,3	2,9	0	4,8	0
			100	82,4	5	3,1	2,3	7,2				
0,82 г L-ТФ (4 мМ=112 мг N= =56 мг N NH ₂)	3	3	216	180	13,8	5,5	3,2	13,7	10,3	2,6	36,5	0
			100	83,3	6,4	2,6	1,5	6,3				
0,61 г D-ТФ (3 мМ=84 мг N= =42 мг N NH ₂)	1	1	190	158	11,7	8,8	4,9	6,6	67,6	17,1	15,3*	0
			100	81,3	6,1	4,6	2,6	3,6				
0,82 г D-ТФ (4 мМ=112 мг N= =56 мг N NH ₂)	3	3	234	197	16,9	8,0	5,3	7,2	71,8	24,9	16,8*	0
			100	84,2	7,2	3,4	2,3	3,2				

IIa. B₆-авитаминозные крысы

Без нагрузки	4	14	156,4	99,3	16,2	3,5	5,2	32,2	0	0	0	0,03
			100	63,6	10,4	2,2	3,3	20,5				
0,35 г L-ТФ (1,7 мМ=48 мг N= =24 мг N NH ₂)	1	1	160	100	18,5	7,8	4,7	29,0	8,8	11,9	173,0	0,35
			100	62,5	11,6	4,9	2,9	18,1				
0,82 г L-ТФ (4 мМ=122 мг N= =56 мг N NH ₂)	2	2	166,4	103,7	18,5	8,4	5,2	30,5	18,8	11,3	485,3	0,52
			100	62,4	11,1	5,0	3,1	18,4				
0,35 г D-ТФ (1,7 мМ=48 мг N= =24 мг N NH ₂)	1	1	170	120,5	18,5	13	3,7	14,3	220,0	90,0	37,0*	0,21
			100	70,8	11,0	7,6	2,2	8,4				
0,82 г D-ТФ (4 мМ=112 мг N= =56 мг N NH ₂)	2	2	205	152,3	20,3	14,1	4,6	13,7	431,0	179,5	50,8*	0,21
			100	74,3	10,0	6,9	2,2	6,6				

IIб. B₆-авитаминозные крысы, леченные перидоксином
(2×100 γ)

0,82 г L-ТФ (4 мМ=112 мг N= =56 мг N NH ₂)	1	1	211	153	17	6,6	4,1	30	28,4	14,6	300,0	0,32
			100	72,9	8,0	3,1	1,9	14,1				
0,82 г D-ТФ (4 мМ=112 мг N= =56 мг N NH ₂)	1	1	204	149,7	20,3	11,6	4,5	18	220,5	77,2	24,0*	0,10
			100	73,4	10,0	5,5	2,3	8,8				

* Окраска не типична.

много кинурина и 3-оксикинурина, ацетилкинуринов, кинуреновой и ксантуреновой кислот и других метаболитов ТФ (ср. (5)).

После нагрузки D-ТФ у B₆-авитаминозных крыс наблюдается прирост N мочевины (и общего азота мочи), доходящий до 50% введен-

ного N *D*-ТФ, причем процент N мочевины в моче повышается с 63 до 70—74% и, соответственно, снижается N «не определяемой» фракции (1). N аминокислот увеличивается до 7—7,6% общего N вследствие экскреции неиспользованного *D*-ТФ (12—13% от введенного, или в 2½—3 раза больше, чем в норме). В виде α-кетокислоты (индол-ПВ) выделяется 4,5—5,0% *D*-ТФ (в 5—7 раз больше, чем у контрольных крыс). Реакция мочи на ксантуреновую кислоту значительно слабее, чем после введения *L*-ТФ. Реакция на кинуренин нетипична и, повидимому, обусловлена другими метаболитами *D*-ТФ (как и у контрольных крыс). На хроматограммах (рис. 1) бросается в глаза полное отсутствие пятен кинуренина (5), 3-оксикинуренина (4) и их ацетилпроизводных (8, 9), при наличии яркого пятна ТФ (6) и слабого хинолинкарбоновых кислот (7).

У *B*₆-авитаминозных крыс, леченных в течение 2 дней пиридоксином (по 100 γ), наблюдается приближение всех показателей обмена *L*- и *D*-ТФ к таковым у контрольных крыс. Однако для полного устранения нарушений обмена ТФ двухдневное лечение витамином *B*₆ оказалось недостаточным.

Обсуждение результатов. Изложенные экспериментальные данные с большой степенью вероятности свидетельствуют об участии реакций переаминирования в синтезе *L*-ТФ из индол-ПВ и в образовании мочевины из аминокислоты *L*-ТФ (непосредственно или после превращения *L*-ТФ в *L*-кинуренин или в *L*-аланин). В соответствии с концепцией о «непрямых» механизмах мочевинообразования и дезаминирования *L*-аминокислот, *L*-ТФ, подобно *L*-фенилаланину, при *B*₆-авитаминозе не используется для синтеза мочевины, и, следовательно, не дезаминируется (1).

У *B*₆-авитаминозных крыс, получавших *L*-ТФ, имела место описанная неоднократно экскреция кинуренина, 3-оксикинуренина и продуктов их ацетилирования и циклизации, обусловленная снижением активности кинурениназы (3-6).

Аминогруппа *D*-ТФ отщепляется оксидазой *D*-аминокислот и при *B*₆-авитаминозе беспрепятственно переходит в мочевины. Но, как и при нагрузке авитаминозных крыс *D*-фенилаланином, нарушение переаминирования препятствует превращению образующейся α-кетокислоты в *L*-аминокислоту (т. е. инверсии *D*-ТФ), что приводит к выделению больших количеств индол-ПВ и неиспользованного *D*-ТФ. Нарушение инверсии *D*-ТФ проявляется и в том, что после его введения у *B*₆-авитаминозных крыс в моче отсутствует *L*-кинуренин, и его метаболиты, которые образуются в организме только из *L*-ТФ и при *B*₆-авитаминозе, вследствие нарушения кинурениназной реакции, поступают в мочу. Отмеченное Котаке у кроликов образование *D*-кинуренина (резистентного к кинурениназе) из *D*-ТФ в наших опытах на крысах отсутствовало. (Источником небольших количеств кинуреновой и ксантуреновой кислот у *B*₆-авитаминозных крыс после введения *D*-ТФ, вероятно, является примесь *L*-изомера в использованном препарате *D*-ТФ.)

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

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
27 X 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 Т. Березов, ДАН, 86, № 3 (1952). 2 Р. Commarata, P. Cohen, J. Biol. Chem., 193, 45 (1951); F. Hird, E. Rowsell, Nature, 166, 517 (1950). 3 А. Браунштейн, Е. Горяченкова, Биохимия, 14, 163 (1949). 4 А. Браунштейн, ДАН, 65, 715 (1949). 5 H. Dalglish, W. Knox, A. Neuberger, Nature, 168, 20 (1951). 6 M. Mason, C. P. Berg, J. Biol. Chem., 195, 515 (1952). 7 H. S. Glazer, J. Muller et al., Arch. Bioch. and Biophys., 33, 243 (1951).