

Е. В. ГОРЯЧЕНКОВА, Б. Я. ВОЛОВНИК и Ф. Р. ЗАЙДЕЛЬМАН

**ВЛИЯНИЕ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ВИТАМИНА В₆
НА ОБРАЗОВАНИЕ МЕРКАПТУРОВОЙ КИСЛОТЫ
И НА ПЕРЕСУЛЬФИРОВАНИЕ В ОРГАНИЗМЕ КРЫС**

(Представлено академиком Н. Н. Аничковым 7 IX 1953)

А. Е. Браунштейном и Е. В. Горяченковой (1) установлено, что энзиматическое образование *L*-цистеина из гомоцистеина и серина в печени крыс протекает при участии фосфопиродоксаля (ФП); две стадии этого процесса, синтез цистатионина и его расщепление, осуществляются различными ФП-энзимами (2). Процесс пересульфирования является одним из основных звеньев обмена серусодержащих аминокислот; поэтому представлялось важным выяснить, в какой мере нарушение активности ферментной системы пересульфирования в печени при авитаминозе В₆ отражается на способности целого организма к образованию цистеина из метионина.

Для выяснения этого вопроса мы избрали два пути, а именно — исследование у нормальных и В₆-авитаминозных крыс: 1) синтеза бромфенилмеркаптуровой кислоты и 2) включения серы метионина в цистин белков внутренних органов. Величины синтеза меркаптуровых кислот до некоторой степени пропорциональны содержанию цистина в пище и (при бедной цистином диете) возрастают после дополнительного введения в организм цист(е)ина или его предшественника — метионина (3). Поэтому прирост выделения меркаптуровой кислоты при нагрузке метионином может в известной мере служить показателем образования цистеина из метионина. Использование S³⁵-метионина и измерение радиоактивности серы меркаптуровой кислотой дают более точное представление об относительной интенсивности образования цистеина в организме за счет серы введенного метионина.

В настоящей работе нами установлено, что после нагрузок бромбензолем добавочное выделение меркаптуровой кислоты за 24 часа опыта при введении *DL*-метионина практически одинаково у В₆-авитаминозных и у контрольных крыс, получающих пиридоксин. Не было отмечено также различия в величинах включения радиосеры меченого метионина в меркаптуровую кислоту, выделенную за 24 часа у авитаминозных и контрольных крыс.

Аналогичные результаты были получены в опытах по исследованию величин включения меченой серы метионина в цистин белков внутренних органов в том случае, когда животные забивались через 24 часа после введения метионина. Однако при сокращении продолжительности опыта до 6 и 4 час. и увеличения нагрузок путем дополнительного введения немеченого метионина одновременно с S³⁵-метионином удалось обнаружить у В₆-авитаминозных крыс снижение включения радиосеры метионина в цистин белков печени (на 30—60%) и других внутренних орга-

нов. В меньшей степени понижены при недостаточности B_6 величины радиоактивности общей серы белков.

Таким образом, несмотря на очень низкую активность ферментной системы пересульфирования в печени при недостаточности витамина B_6 (1, 2), в целом организме нарушение превращения метионина в цистин остается компенсированным при 24-часовом опыте и выявляется только при более кратковременном наблюдении.

Опыты, поставленные одним из авторов (Горяченкова), позволили объяснить причину этого явления. Оказалось, что пересульфирование в организме крысы происходит не только в печени, но и в ряде других органов. Вследствие неравномерного истощения запаса фосфопиридоксала в органах, при B_6 -авитаминозе в некоторых из них (например, в почках, в селезенке) активность пиридоксальных ферментов пересульфирования остается довольно высокой. Образующийся в этих органах цист(e)ин, циркулируя в организме, поступает в органы, утратившие способность к пересульфированию (например, в печень), используется при синтезе белков, меркаптуровых кислот и т. п. Вследствие этого нарушение пересульфирования в организме B_6 -авитаминозных крыс не достигает такой значительной степени, как в переживающей ткани печени, и при большой продолжительности опыта пониженная скорость образования цист(e)ина остается замаскированной.

Экспериментальная часть

Синтез бромфенилмеркаптуровой кислоты в организме крыс (Горяченкова и Зайдельман). B_6 -авитаминоз вызывался у молодых крыс при помощи обычного в работах нашей лаборатории рациона, содержащего 40% казеина и все необходимые витамины, кроме B_6 ; контрольные крысы получали тот же рацион с добавкой 100 γ солянокислого пиридоксина. За 2—3 дня до опыта животных переводили на диету с пониженным содержанием цистина и метионина, содержащую: казеина 6%, сахарозы 15%, крахмала 50%, лярда 25%, солевой смеси 4%; витамины давались в тех же дозах, что и в предварительном периоде. Животные получали с промежутками по 4—5 дней повторные нагрузки бромбензола (по 55—60 мг в подсолнечном масле через желудочный зонд) без метионина или с одновременным введением *DL*-метионина (по 30 мг per os). В моче, собранной за 24 часа, определяли количество выделенной меркаптуровой кислоты иодометрическим (4) и весовым (4) методом (в виде ртутного соединения бромфенилмеркаптана, отщепляемого при щелочном гидролизе); величины синтеза меркаптуровой кислоты вычисляли в процентах от введенного бромбензола. В части опытов дополнительно вводили (подкожно) радио-*DL*-метионин (2000—2500 имп/мин на 1 г веса животных); радиоактивность полученного из мочи бромфенилмеркаптида ртути измеряли на торцовом счетчике. Всего было исследовано свыше 20 опытных и 15 контрольных крыс.

В опытах без метионина контрольные крысы выделяли в виде меркаптуровой кислоты в среднем 28,6% (22—35%) введенного бромбензола, а B_6 -авитаминозные — несколько меньше, в среднем 23,2% (20—27%). Следовательно, существенного нарушения образования меркаптуровой кислоты при B_6 -авитаминозе не наблюдается (этот факт представляет самостоятельный интерес, так как некоторые другие тиоэфиры цистеина синтезируются пиридоксальпротеидами (2)). Некоторое снижение синтеза у B_6 -авитаминозных крыс, повидимому, объясняется снижением у них запасов цистина, доступного использованию в этом процессе. При дополнительном введении метионина выделение бромфенилмеркаптуровой кислоты повышается у обеих групп животных, достигая в среднем 38,5% (30—47%) у контрольных и 34,6% (22—46%) у авитаминозных крыс. Добавочный синтез меркаптуровой кислоты за счет введенного метионина

составляет, соответственно, 11,4 и 9,9%, т. е. практически одинаков у крыс обеих групп.

В опытах, где крысам, кроме бромбензола и обыкновенного метионина, вводился одновременно S^{35} -метионин, радиоактивность ртутного меркаптида, выделенного из мочи, также оказалась одинаковой у контрольных и B_6 -авитаминозных крыс; в этих опытах показано близкое соответствие количеств меркаптуровой кислоты, найденных в моче 3 крыс при параллельном иодометрическом и весовом определении.

Таблица 1

Включение серы метионина в бромфенилмеркаптуровую кислоту у крыс

Крысы	Число крыс	Вес крыс в г	Уд. активность Hg-меркаптида в имп/мин.	Выделение бромбензола в виде меркаптуровой к-ты в %	
				иодометрич. метод	вес. метод
B_6 -авитаминозные . .	5	74—90	169; 192; 200; 259; 265	35; 43	34; 45
Контрольные	4	69—110	178; 220; 231; 272	42	43

Включение серы метионина в цистин тканевых белков в организме крысы (Воловник). Для опытов были использованы крысы с типичными явлениями B_6 -авитаминоза (после 6—8 недель на диете без пиридоксина). Всего проведено 8 серий опытов на 19 авитаминозных и 17 контрольных крысах (см. табл. 2).

Таблица 2

Влияние B_6 -авитаминоза на включение серы метионина в тканевые белки (радиоактивность в имп/мин. на 10 мг $BaSO_4$)

№№ серий	Введено на 100 г. веса животн.		Продолжит. опыта в час*	Число крыс	Общая сера						Сера цистина					
	S^{35} в имп/мин.	метионина в мг			печень			внутрен. органы			печень			внутрен. органы		
					контроль	авитамин.	снижение, %	контроль	авитамин.	снижение, %	контроль	авитамин.	снижение, %	контроль	авитамин.	снижение, %
1	300000	—	24	4				1200*	1200*	—				1900*	1850*	—
2	300000	—	24	4				760	750	—				770*	820*	—
3	400000	—	6	7	2700	3000	—	3400	3300	—	2750	1740	37	1160	1270	—
4	300000	—	6	3	900	660	27	760	750	—	760	660	13	430	400	—
5	300000	60	6	4	600	440	27	600	400	33	500	160	68	360	150	58
6	380000	60	4	6	400	260	35	300	200	33	500	275	45	240	120	50
7	400000	60	4	4	450	300	33	500	250	50	460	250	45	200	200	—
8	600000	60	4	4	730	480	34	700	500	29	1000	400	60	650	300	54

* Включая печень.

Животным одновременно вводили под кожу DL -метионин S^{35} (3000—6000 имп/мин. на 1 г живого веса). В сериях 5—8 величина нагрузки была повышена путем добавления к вводимому радиометионину обыкновенного метионина (60 мг на 100 г живого веса). Через различные промежуточные периоды (24—6—4 часа) крыс забивали, печень и остальные внутренние органы от одноименных групп животных объединяли и выделяли из них белки путем обработки трихлоруксусной кислотой, спиртом и эфиром.

Часть высушенных белков окисляли по методу Пири (5) для осаждения всей серы в виде $BaSO_4$. Из других порций белка выделяли в виде $BaSO_4$ серу цистина после окисления белка щелочным перманганатом по методу Кэллан и Тенниса (6). Проверочные опыты с добавлением радиометионина к белку подтвердили, что при этом способе окисления сера метионина не переходит в сульфат. Осадки $BaSO_4$, полученные обоими методами, взвешивались и радиоактивность сульфатов измерялась на торцовом счетчике. Колориметрические определения цистина и метионина в гидролизатах белков показали, что содержание этих аминокислот одинаково в одноименных белковых препаратах от контрольных и B_6 -авитаминозных крыс.

В опытах 1-й и 2-й серии (табл. 2) радиоактивность серы цистина и общей серы в суммарном белке всех внутренних органов, взятых через 24 часа после введения S^{35} -метионина, оказалась одинаковой у крыс контрольной и авитаминозной групп.

Отчетливое снижение радиоактивности серы цистина у авитаминозных крыс было выявлено в последующих опытах (где исследовались отдельно белки печени и остальных внутренних органов) при укорочении срока жизни крыс после нагрузки до 6 и 4 час. Особенно значительно снижение в сериях 5—8, в которых для большей загрузки ферментной системы пересульфирования субстратом крысам вводили дополнительно 60 мг метионина. В этих сериях содержания S^{35} у авитаминозных крыс в цистиновой сере печени было снижено на 45—60%, а в общей белковой сере на 20—40%. Из этого следует, что в виде второго серусодержащего компонента белка — метионина — в органы опытных и контрольных крыс включались почти одинаковые количества радиосеры.

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

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
19 V 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Браунштейн, Е. Горяченкова, ДАН, 74, 529 (1950). ² Е. Горяченкова, ДАН, 85, № 3, 603 (1952). ³ J. Stekol, J. Biol. Chem., 122, 333 (1937). ⁴ J. Stekol, *ibid.*, 113, 279 (1936). ⁵ N. Pirie, Biochem. J., 26, 2044 (1932). ⁶ T. Callan, G. Tonniss, *Ind. a. Eng. Chem., Analyt. Ed.*, 13, 450 (1941).