

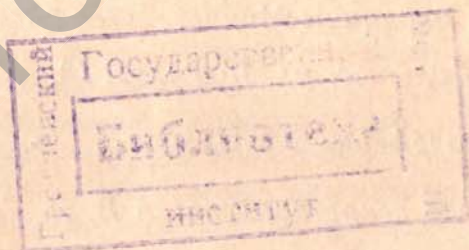
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ЛИТОВСКОЙ ССР

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ
МЕДИЦИНЫ

А. Г. МАЖУЛЬ

О возможном характере
взаимодействия производных тиамин
с пиридоксальными ферментами

093 — Биологическая химия



А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Вильнюс — 1970 г.

Библиотека УО ГрГМУ



0000215026

Работа выполнена на кафедре биохимии (зав. кафедрой— профессор Ю. М. ОСТРОВСКИЙ) Гродненского государственного медицинского института (ректор—доцент Д. А. МАСЛАКОВ).

Научный руководитель—доктор медицинских наук, профессор Ю. М. ОСТРОВСКИЙ.

Диссертационная работа изложена на 230 стр. машинописи, куда входят 43 таблицы и 4 рисунка.

Список цитируемой литературы охватывает 472 источника, в том числе 141 отечественных авторов.

Официальные оппоненты:

1. Доктор биологических наук А. И. МАЛАХОВСКИЙ
2. Кандидат биологических наук А. В. ЛЯТУКЕНЕ.

Защита состоится «.....».....1971 года на заседании Ученого Совета института экспериментальной и клинической медицины Министерства здравоохранения Литовской ССР, г. Вильнюс, ул. Пожелос, 18.

Автореферат разослан «.....».....1970 года.

Ученый секретарь Совета В. И. АСТРАУСКАС.

Широкое применение витаминов для лечебных целей связано с повсеместным использованием таких их доз, которые в несколько, иногда в десятки и сотни раз превышают физиологические потребности человека. Учитывая, что в подавляющем большинстве случаев речь идет о применении одного-двух отдельно взятых витаминов, естественно встает вопрос о рациональных границах такой терапии. Если говорить о тиамине, который особенно широко применяется при некоторых заболеваниях (различные поражения нервной системы, сахарный диабет, сердечно-сосудистая недостаточность и др.), то здесь приходится считаться еще и с появлением новых препаратов, обладающих отчетливо выраженным пролонгированным действием как, например, тиаминфосфатов.

Сама постановка вопроса о рациональности и о границах тиаминотерапии может быть достаточно обоснована и уже имеющимися на этот счет данными других авторов. Показано, например, что большие дозы тиамина тормозят всасывание витамина В₆ из кишечника (Маджияр, Габор, 1949) или усугубляют течение авитаминозов (Терруан, 1966).

Одному из частных вопросов в изучении такого нежелательного побочного действия тиамина, его взаимоотношениям с витамином В₆ и посвящена настоящая работа.

Выбор конкретной темы во многом определился уже имеющимися на нашей кафедре данными по механизму действия тиамина и тем, что в предварительных опытах была показана вторая сторона антагонистических взаимоотношений между обоими витаминами: большие дозы пиридоксина тормозили связывание тканями меченого тиамина (Островский Ю. М., 1966).

С чисто биохимической точки зрения для изучения вза-

Принятые сокращения: Т—тиамин, ТМФ, ТДФ—тиаминмоно-и-дифосфат соответственно, КГК—альфа-кетоглутаровая кислота, ГАМК—гамма-аминомасляная кислота, АСТ—аспартат-трансаминаза, АЛТ—аланин-трансаминаза, ТП—токопиримидин, ГДК—глутаматдекарбоксилаза, ПАЛФ—пиридоксальфосфат, ПК—пировиноградная кислота.

нимоотношений между тиамином и витамином В₆ имеется несколько веских предпосылок:

1) некоторые ферменты, содержащие в качестве активных группировок пиридоксальфосфат или тиаминдифосфат, осуществляют свое действие на одних и тех же общих субстратах — альфа-кетокислотах;

2) превращение обоих витаминов в соответствующие коферменты включает сходные киназные реакции, возможно, связанные с общим ферментативным белком (Шевильяр, Тоэ, 1951);

3) в ходе внутритканевого обмена тиамин образуется аминопиримидиновый осколок (токсопиримидин), известный своими антивитаминными по отношению к пиридоксину свойствами (Абдергальден, 1954; Макино и др., 1954; Букин Ю. В., 1964; 1966; 1969).

В разрешении стоящих перед нами задач мы прибегли к нескольким вариантам опытов, которые включали изучение витаминных свойств тиаминфосфатов (наблюдения в клинике, эксперименты на животных) и характеристику состояния обмена витамина В₆ по активности трансминаз, глутаматдекарбоксилазы, обмену триптофана.

Некоторые вопросы, связанные с выяснением возможных механизмов взаимоотношений между двумя витаминами, разрешались в модельных опытах на уровне отдельных ферментных белков (пируватдегидрогеназа, апотрансминаза).

Методы исследования.

Всего в опытах было использовано 130 белых крыс и 30 белых мышей. Насыщение организма животных тиамином, в дозах эквивалентных лечебным для человека, достигалось длительным (1—2 месяца) ежедневным подкожным введением крысам по 1 мг витамина или эквимоллярных ему количеств ТМФ или ТДФ.

Токсическая доза тиамин (650 мг/кг) вводилась однократно внутривентриально.

Образование ксантуреновой кислоты из триптофана (давался через рот в количестве 300 мг/кг) исследовалось за 24 часа на фоне действия подкожно введенного тиамин, ТМФ или ТДФ, примененных в дозе, эквивалентной 100 мг/кг тиамин.

Действие антиметаболитов тиамин изучалось на белых мышцах, которые получали подкожно окситиамин (дважды в течение 24 часов по 200 мг/кг) или пиритиамин (однократно в течение 24 часов в дозе 300 мг/кг).

Все контрольные животные получали соответствующим образом равные по объему количества изотонического раствора хлористого натрия.

В опытах с кратковременным действием изучаемых препаратов все животные содержались с водой, но без пищи.

От убитых обезглавливанием животных на холоду брали печень, почки, мозг, сердце, которые гомогенизировали на изотоническом растворе хлористого натрия при 0°C. Полученные гомогенаты или их центрифугаты разводили соответствующим образом (1:20—1:400) для определения активности трансаминаз (по методу Рейтман и Френкеля (1957)), глутаматдекарбоксилазы манометрическим методом Робертс и Френкель (1951) или радиометрически (Фронталы, 1961) с 5-C¹⁴-глутаминовой кислотой (уд. активность 2,7 мкюри/г) после выделения хроматографически C¹⁴-гамма-аминомасляной кислоты (ленинградская бумага марки «Б»; смесь для разведения: третичный бутанол—ледяная уксусная кислота—вода 90:10:25). Подсчет радиоактивности производили под торцовым счетчиком на установке ПП-8. Количество ксантуреновой кислоты в суточной моче определяли по Г. Я. Виленкиной (1959); белок в центрифугатах гомогенатов по биуретовой реакции с реактивом Горналя (В. С. Асатиани, 1957). Апопируватдегидрогеназу из грудных мышц голубя выделяли по методу В. А. Энгельгардта и С. И. Канопкайте (1957). Полученный препарат обладал естественной трансаминазной и после добавления ТДФ дегидрогеназной активностью, которую определяли спектрофотометрически (Гублер, 1961) по восстановлению феррицианидом калия.

Аспартат-апо-трансаминазу получали из пекарских дрожжей по методу Е. В. Горяченковой (1963). Влияние тиамин, окситиамина, пириптиамин, тетрагидротиамина, ТМФ и ТДФ на активность реактивированного, добавлением пиридоксальфосфата, фермента определяли в трис-НСI-буфере (рН 7,4). Измерение спектров поглощения растворов, содержащих апо-трансаминазу, пиридоксальфосфат и тиамин или его производные, производили в области 310—450 мкм на спектрофотометре СФ-4.

Наблюдения на людях. Обследовано 42 больных, находившихся на стационарном лечении в отделении нервных болезней Гродненской областной клинической больницы, которым с лечебной целью было показано применение тиамин.

В суточной моче определяли содержание тиамин (Г. Д. Елисева, 1953) и бисульфитсвязывающих веществ (А. М. Петрунькина, 1951) до и после однократного внутримышечного введения 25 мг тиаминбромид или эквимольных ему доз ТМФ и ТДФ.

В работе использовали ТМФ, любезно представленный В. М. Березовским (лаборатория синтеза коферментов ВНИВИ, Москва), ТДФ—«Польфа» (Польша), триптофан—фирмы «Реанал» (Венгрия), пиритиамин — фирмы «Сигма» (США), окситиамин получен из тиаминхлорида по Ридону (1951).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение усвояемости тиамин и тиаминфосфатов у людей.

Наблюдениями на больных показано, что тиаминфосфаты значительно лучше депонируются в организме, чем свободный тиамин: после инъекций эквимолярных доз (25 мг) тиамин, ТМФ и ТДФ в суточной моче соответственно находили тиамин $8,23 \pm 0,32$; $3,13 \pm 0,57$ ($t=8,67$; $P<0,001$) и $1,78 \pm 0,29$ ($t=13,66$; $P<0,001$) мг. Наши данные, полученные при наблюдении в клинике, хорошо согласуются с исследованиями А. Я. Розанова (1960), установившим, что тиаминфосфаты не только лучше депонируются в организме животных, но и медленнее распадаются до невитаминных продуктов по сравнению с тиамин.

Одновременно с лучшей усвояемостью ТДФ по сравнению с ТМФ и тиамин, мы обнаружили и большую биохимическую активность кофермента, что проявилось в выраженной тенденции к снижению выведения бисульфитсвязывающих веществ (БСВ) с мочой больных после инъекций ТДФ, но не ТМФ или тиамин (табл. 1).

Табл. 1

Среднесуточное выведение БСВ (в мг) с мочой после внутримышечных инъекций эквимолярных доз (25 мг) тиамин, ТМФ, ТДФ.

Показатель	Тиамин		Т М Ф		Т Д Ф	
	до введения	после введения	до введения	после введения	до введения	после введения
n	24	24	17	17	14	14
M±m	418±30	425±20	529±47	472±36	530±52	437±38
±б	145	109	195	148	193	144
t		0,22		1,04		1,44
p		>0,5		<0,5		0,1÷0,2

Это обстоятельство можно рассматривать как косвенное

подтверждение нашего предположения о том, что после введения коферментной формы тиамин фосфата возможно возникновение в целом организме конкурентных взаимоотношений между тиамином и пиридоксинем в ферментативных реакциях за общие субстраты (альфа-кетокислоты).

Большая стабильность тиаминфосфатов как-будто уменьшает опасность появления токсического действия токсопиримидина (известного антагониста витамина В₆), но одновременно увеличивается вероятность конкуренции пиридоксалевого и тиаминовых ферментов на субстратном уровне. Введение уже фосфорилированных форм тиамин фосфата уменьшает также вероятность усиления изучаемого нами антагонизма за счет конкуренции в киназных реакциях, но одновременно заставляет опасаться новых нежелательных реакций: конкуренции фосфорилированных коферментов за участки апоферментов, ответственных во взаимодействии с фосфатным радикалом.

Исходя из вышеизложенного, мы в дальнейшем исследовали взаимоотношения между тиамином и его производными с одной стороны и пиридоксинем с другой сразу по нескольким показателям: обмену триптофана и активности пиридоксалевого ферментов (глутаматдекарбоксилазы и трансаминазы).

Влияние тиамин фосфата и тиамин дигидрофосфата на обмен триптофана у белых крыс. До образования кинуренина и 3-оксикинуренина на окислительных этапах распада триптофана необходимо присутствие витаминов В₁ и В₂. Последующие превращения 3-оксикинуренина, контролируемые пиридоксинем, ведут к образованию ксантуреновой или никотиновой кислот (А. Е. Браунштейн, 1953; Е. В. Горяченкова, 1954; Дэлглиш, 1952, 1954; 1956; Готтингер и Бергер, 1964).

В наблюдениях на целых животных установлено, что экскреция ксантуреновой кислоты с мочой после нагрузки триптофаном является достаточно чувствительной пробой, характеризующей обеспеченность целого организма пиридоксинем (Г. Я. Виленкина, 1959; Готтингер и Бергер, 1964). Считается, что даже легкие формы недостаточности витамина В₆ резко тормозят активность кинурениназы, но еще не сказываются на трансаминазе 3-оксикинуренина, в связи с чем типичным признаком гиповитаминоза-В₆ и является увеличение экскреции с мочой ксантуреновой кислоты.

Введение крысам тиамин фосфата или его производных по-разному влияет на выведение ксантуреновой кислоты: после тиамин фосфата имеется лишь тенденция ($0,41 \pm 0,03$ и $0,65 \pm 0,07$; $P < 0,1$), а после ТДФ отчетливое возрастание количества этой кислоты (мг) в суточной моче ($0,48 \pm 0,05$ и $1,37 \pm 0,29$; $P < 0,01$).

ТДФ никакого эффекта не оказывал ($0,44 \pm 0,04$ и $0,38 \pm 0,04$; $P < 0,5$).

Механизм действия вводимых производных тиамин, по видимому, различен в некоторых деталях. Так, свободный тиамин наиболее заметно распадается с образованием токопиримидина (ТП) и подвергается сам активному фосфорилированию. Оба фактора могут привести к одному и тому же результату — частичному дефициту пиридоксальфосфата (ПАЛФ), тем более, что соответствующие киназы обоих витаминов действуют на одном и том же субклеточном уровне. ТДФ уже вряд ли имеет отношение к эффектам в реакциях фосфорилирования, он в значительной степени более устойчив к распаду в тканях с образованием ТП, поэтому его еще более яркое влияние на образование ксантуреновой кислоты можно попытаться объяснить лишь одним — конкуренцией ТДФ и ПАЛФ по фосфатным группировкам за связь кофермента с апоферментом. Учитывая известную лабильность связи ПАЛФ с кинурениназой, такое допущение представляется вполне приемлемым. Отсутствие эффекта после нагрузки животных ТДФ требует новых объяснений, которые, как нам кажется, необходимо искать во влиянии ТДФ на активность трансаминазы 3-окскинуренина. Вторым субстратом этой реакции является альфа-кетоглутаровая кислота (КГК), а ее обмен (окислительное декарбоксилирование) контролируется ТДФ таким образом, что возрастание соответствующей дегидрогеназы (Ю. М. Островский, Л. Я. Макарина-Кибак, 1967) за счет конкуренции на субстратном уровне будет тормозить упомянутую выше реакцию переаминирования. Таким образом, если ТДФ и проявлял сам по себе какие-либо антагонистические отношения с лабильно связанным ПАЛФ при протеидизации в составе кинурениназы, то это его действие не даст о себе знать накоплением ксантуреновой кислоты из-за возможного одновременного торможения переаминирования 3-окскинуренина с КГК. Некоторые подтверждения последних возможностей мы нашли и в своих последующих наблюдениях, касающихся других пиридоксальных ферментов.

Исследования на уровне ферментов.

Активность глутаматдекарбоксилазы (L—глутамат-1-карбоксилаза, КФ 4.1.1.15) мозга крыс после длительного введения животным тиамин, ТДФ и ТДФ. Глутаматдекарбоксилаза (ГДК)—ферментная система, также зависящая от пиридоксина, присутствует преимущественно в нервной тка-

ни, в связи с чем исследованию подвергался только мозг животных. Наше внимание к ГДК обусловлено, с одной стороны, непрочностью связи ПАЛФ (Робертс и Френкель, 1951) с ферментом и чувствительностью последнего к недостатку пиридоксина в целом организме, а с другой стороны—известной нейротропностью самого тиаминна и образующегося из него в организме токсопиримидина. Интересной, в свете приведенных ранее данных о конкуренции тиаминных и пиридоксальных ферментов на субстратном уровне, представлялась и связь гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) — продукта декарбоксилирования глутаминовой кислоты (ГК), с реакциями переаминирования, в которых участвует КГК.

Длительное введение животным тиаминна в дозах эквивалентных лечебным и, в меньшей степени, введение токсических доз (236 ± 13 и 207 ± 13 ; $P > 0,1$) подавляли декарбоксилирование ГК (табл. 2). Слабая выраженность эффектов при манометрическом определении ГДК, по-видимому, обусловлена усиленным декарбоксилированием в опытных пробах (Ю. М. Островский, Л. Я. Макарина-Кибак, 1967) эндогенных кетокислот и образующейся из глутаминовой кислоты за счет переаминирования КГК. Действительно, если к гомогенатам мозга мы добавляли вместо глутаминовой кислоты в десять раз меньше КГК, то выделение углекислоты в опытных пробах (172 мкл/г/час) было больше, чем в контрольных (152 мкл). Сам по себе этот факт еще раз показывает, что избыточное введение тиаминна активирует декарбоксилирование кетокислот, создавая предпосылки для дефицита одного из субстратов в реакциях переаминирования. С другой стороны, как это недавно показано на примере авитаминоза В₁, избыток кетокислот в мозгу приводит к обратному сдвигу — снижению уровня ГАМК (Гублер, 1968). Последующие наблюдения, в связи с этим, были проведены более специфическим методом, основанным на определении С¹⁴-ГАМК, выделенной из проб хроматографически после инкубации гомогенатов мозга с 5-С¹⁴-ГК. ТМФ и ТДФ отчетливо подавляли образование С¹⁴-ГАМК в гомогенатах мозга крыс, а ПАЛФ, добавленный *in vitro*, реактивировал фермент, не влияя на декарбоксилирование ГК в контрольных пробах (табл. 2). Все эти данные говорят о присутствии в опытных пробах нормального количества апо-ГДК, часть которой или не содержит ПАЛФ из-за общей недостаточности пиридоксина, вызванной введением тиаминна (торможение киназных реакций, образование ТП) или ввиду некоторого конкурентного вытеснения ПАЛФ из фермента тиаминфосфатами.

Активность глутаматдекарбоксилазы мозга крыс после введения терапевтических доз тиамин (микролитры $\text{CO}_2/\text{г}$ сырой ткани/час) или эквивалентных ему доз ТМФ и ТДФ (имп/мг сырой ткани/100 сек).

Препарат	Показатели	Контроль	Контроль	Опыт	Опыт +ПАЛФ
		+ПАЛФ			
		1	2	3	4
Тиамин	n*	—	6	6	—
	$M \pm m$	—	221 ± 4	208 ± 3	—
	P	—	—	$P_{2;3} < 0,02$	—
ТМФ	n	10	10	10	10
	$M \pm m$	212 ± 11	218 ± 13	171 ± 8	200 ± 11
	P	$P_{1;2} > 0,5$	—	$P_{2;3} < 0,01$	$P_{1;4} < 0,5$ $P_{2;4} < 0,5$ $P_{3;4} < 0,05$
		—	—	—	—
ТДФ	n	12	11	12	12
	$M \pm m$	189 ± 14	219 ± 17	150 ± 10	198 ± 10
	P	$P_{1;2} < 0,2$	—	$P_{2;3} < 0,01$	$P_{1;4} > 0,5$ $P_{2;4} < 0,2$ $P_{3;4} < 0,01$
		—	—	—	—

Активность тканевых трансаминаз (L—аспартат: 2-оксоглутарат-аминотрансфераза, КФ 2.6.1.1 и L—аланин: 2-оксоглутарат-аминотрансфераза, КФ 2.6.1.2) после длительного введения животным тиамин, ТМФ и ТДФ. Уже ранее Ю. М. Островский и Н. С. Непочелович (1963) при введении белым мышам токсических доз тиамин наблюдали торможение трансаминазной активности в отдельных тканях. При повторении опыта в сходных условиях на крысах подобных сдвигов не наблюдалось (табл. 4), а дополнительное введение пиридоксина (650 мг/кг) даже несколько угнетало активность аспартат-трансаминазы (АСТ) в ткани почек. Длительное насыщение животных производными тиамин, в дозах эквивалентных лечебным, не вызывало каких-либо заметных изменений в случае свободного тиамин, незначительно повлияло на аланин-трансаминазу (АЛТ) в ткани мозга после введения ТМФ и достоверно подавило фермент в мозгу и почках только в случае введения ТДФ (таблица 3). Наибольшая эффективность коферментной формы тиамин и выраженная чувствительность к производным тиамин аланин-трансаминазы склонили нас к представлениям, что основные взаимоотношения между изучаемыми нами витаминами разгравываются где-то в реакциях на уровне использования общих субстратов, в частности альфа-кетокислот. В условиях, когда животным вводились большие дозы антиметаболитов тиа-

*) Гомогенат мозга каждой пробы, взятой для исследования, являлся усредненным от двух животных, убитых одновременно.

Табл. 3

Активность трансаминаз в различных тканях крыс после длительного введения тиамин (мкмоль ПК/г сырой ткани/20 мин.), ТМФ и ТДФ (мкмоль ПК/10 мг белка/20 мин.)

Аланин-трансаминаза

Исследуемая ткань	Показатели	Тиамин		Т М Ф		Т Д Ф	
		контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Мозг	$M \pm m$ р	$15,0 \pm 0,38$ >0,5	$15,5 \pm 0,42$	$2,57 \pm 0,049$ >0,05	$2,43 \pm 0,052$	$2,93 \pm 0,094$ <0,01	$2,58 \pm 0,044$
Сердце	$M \pm m$ р	$33,6 \pm 0,74$ <0,5	$34,4 \pm 0,62$	$2,93 \pm 0,098$ >0,5	$3,06 \pm 0,099$	$2,94 \pm 0,027$ >0,5	$2,76 \pm 0,067$
Печень	$M \pm m$ р	$336 \pm 11,2$ >0,5	$341 \pm 13,8$	$23,4 \pm 1,08$ >0,5	$23,2 \pm 0,43$	$19,5 \pm 0,84$ <0,02	$22,7 \pm 0,79$
Почка	$M \pm m$ р	$25,8 \pm 0,50$ >0,5	$26,1 \pm 0,45$	$2,34 \pm 0,085$ <0,5	$2,52 \pm 0,116$	$2,72 \pm 0,092$ <0,01	$2,37 \pm 0,060$

Аспаргат-трансаминаза

Мозг	$M \pm m$ р	$122 \pm 4,0$ <0,5	$116 \pm 4,4$	$25,1 \pm 0,72$ >0,5	$24,5 \pm 0,57$	$23,1 \pm 0,93$ <0,1	$21,0 \pm 0,61$
Сердце	$M \pm m$ р	$434 \pm 12,3$ >0,5	$444 \pm 10,2$	$39,7 \pm 0,54$ >0,5	$39,5 \pm 0,56$	$34,4 \pm 0,50$ >0,5	$33,8 \pm 1,08$
Печень	$M \pm m$ р	$227 \pm 5,4$ <0,5	$236 \pm 8,4$	$14,7 \pm 0,43$ >0,05	$13,5 \pm 0,42$	$13,0 \pm 0,63$ >0,5	$14,2 \pm 1,40$
Почка	$M \pm m$ р	$160 \pm 3,7$ >0,5	$157 \pm 5,4$	$17,1 \pm 0,59$ >0,5	$17,4 \pm 0,57$	$14,1 \pm 0,28$ >0,5	$13,0 \pm 0,36$