

УДК 57.042.2

ПИЗАМИН – ПРИРОДНЫЙ ИНГИБИТОР КОА В ПРОРОСТКАХ ГОРОХА**¹Смашевский Н.Д., ¹Ионова Л.П., ²Мойсеенок А.Г.**¹*Астраханский государственный университет, Астрахань;*²*Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно,
e-mail: Smashevsky@yandex.ru*

В статье представлены результаты изучения антивитамина пантотеновой кислоты (ПК) пизамина, из проростков гороха *Pisum sativum* L., подавляющего каталитические функции активного производного ПК КоА. Пизамин подавляет *in vitro* реакции, катализируемые КоА: ацетилирование ПАБК, трансацетилирование в реакциях образования эфира, синтез хлорофилла в изолированных семядолях огурца и кабачка, усвоение углерода при фотосинтезе листьями 14-дневных проростков фасоли. Содержание хлорофилла и линейный рост междоузлий проростков гороха полностью коррелируют с содержанием в них эндогенного пизамина. Это позволяет заключить, что пизамин является природным ингибитором КоА, который через ПК подавляет каталитические функции КоА в метаболических процессах, т.е. является его природным антикоферментом.

Ключевые слова: пизамин, КоА, антикофермент, ингибитор, синтез хлорофилла, антивитамины, горох *Pisum sativum* L., изолированные семядоли, ацетилирование, трансацетилирование

PISAMIN – A NATURAL INHIBITOR OF COA IN PEA SEEDLINGS**¹Smashevsky N.D., ¹Ionova L.P., ²Moiseenok A.G**¹*Astrakhan State University, Astrakhan;*²*Institute of Biochemistry of biologically active compounds NASB, Grodno,
e-mail: Smashevsky@yandex.ru*

The article submitted study results of antivitamin pantothenic acid (PA) pisamin, pea seedlings of *Pisum sativum* L., the vast catalytic function of the active derivative PA CoA. Pisamin inhibits *in vitro* reactions catalyzed by CoA: acetylation of PABA, transacetylation reactions of ether formation, the synthesis of chlorophyll in isolated cotyledons of cucumber and zucchini, the assimilation of carbon during photosynthesis leaves of 14-day-old seedlings bean. The chlorophyll content and the linear growth of internodes of pea seedlings completely correlate with their content of endogenous pisamina. This suggests that a pisamin is natural inhibitor CoA, which across a PA inhibits the catalytic function of CoA in metabolic processes, i.e. is its natural antikoferment.

Keywords: pisamin, CoA, antikoferment, ingibior, antivitamin, pea *Pisum sativum* L., isolated cotyledons, hlorofill sintez, acetylation, transacetylation

Из проростков гороха *Pisum sativum* L. изолирован ингибитор подавляющий рост дрожжевых культур, нуждающихся в экзогенной пантотеновой кислоте [6] и высших растений [7]. Его действие устраняется только витамином пантотеновой кислоты (ПК), и он классифицирован как антивитамины пантотеновой кислоты и получил условное название Пизамин так как обнаружен у всех видов рода *Pisum* [8]. Подавляя ПК в биохимических реакциях он не является её конкурентным антагонистом, совершенно не влияет на её биологический синтез и проявляет биологическое действие только в присутствии ПК [9]. Идентификация показала, что это водорастворимый олигосахарид, состоящий из остатков простых сахаров: арабинозы (3,35%), рибозы (7,85%), ксилозы (11,3%), маннозы (2,8%), галактозы (10,7%), глюкозы (36,4%) и галактуроновой кислоты (27,6%) [10]. Учитывая тот факт, что ПК входит в состав многофункционального (катализирует около 130 биохимических реакций) кофермента (КоА), который признан единственной активной формой ПК [5]. Поэтому мы считаем, что пизамин является антикофер-

ментом КоА. В литературе описаны факты присутствия в водных экстрактах растений антикоферментов CoA [3]. В опытах *in vitro* в экстрактах подсолнечника, фасоли, обнаружены ингибиторы ацетилирования сульфаниламида, и авторы заключили, что торможение ацетилирования связано с наличием в экстрактах полифенольных соединений. В данном сообщении представлены исследования, направленные на доказательство антиметаболического антикоферментного действия пизамина в отношении КоА на некоторые биохимические и физиологические процессы, в которых непосредственно участвует КоА

Материалы и методы исследования

В качестве тест-объекта использовали проростки гороха *Pisum sativum* L., выращиваемые на свету и в темноте, изолированные семядоли огурца (*Cucumis sativum* L.) и кабачка (*Cucurbita pepo* L.), листья фасоли. Реакцию ацетилирования ПАБК проводили по методу Липмана, в модификации Сытинской О.Н. [12] и трансацетилирования по методу Mc Dongal D.B. и Gargar R.V. [15]. Содержание хлорофилла определяли в спиртовой вытяжке на фотоэлектродориметре КФК-2 МП с вычислением содержания количества хлорофилла по калибровочной кривой

и выражали в мг/г сырого веса [2]. Продуктивность фотосинтетического аппарата определяли в листьях фасоли, сравнивая содержание углерода в контрольных и опытных листьях, после сжигания в хромовой смеси (1). Семена фасоли замачивали в течение 24 часов, и набухшие семена помещали во влажный прокаленный речной песок для прорастивания. Четырехдневные одинаковые по размеру проростки пересаживали на раствор Кнопа по 3 штуки на сосуд и ежедневно освещали по 9 часов в течение 14 дней. Перед анализом все растения помещали в темноту на 48 часов для расходования продуктов фотосинтеза. У побегов удаляли верхушки, а снизу подрезали над семядольными листьями. В таком состоянии черенки с листьями помещали в колбочки Бунзена с раствором, содержащего 300 мкг/мл пизамина и инфильтрировали в листья под вакуумом в течение 30 минут. Контрольный вариант инфильтрировали дистиллированной водой. В опыт брали первую пару настоящих листьев: один лист брали для определения исходного содержания углерода, а второй вместе с побегом погружали в воду и выставляли на свет на 20 часов, после чего в них определяли содержание углерода.

С каждого листа после насыщения в воде в течение 30 минут брали по 6 высечек пробочным сверлом диаметром 1 см. Повторность 4-кратная. Высечки переносили в пробирки с 10 мл хромовой смеси и вместе с высечками кипятили 5 минут на песочной бане, и затем определяли по оптической плотности содержание углерода в мг/дм²/час. Растения выращивали в фотостате под лампой ДРЛ 250 w на 1 м².

Результаты исследования и их обсуждение

Механизм действия пизамина был изучен *in vitro* на реакциях, которые непосредственно осуществляются катализом КоА или его участием в качестве субстрата в метаболических реакция. В таких опытах более конкретно увязана связь пизамина с КоА. Мы использовали самый показательный классический опыт реакцию ацетилирования ПАБК [12] Результаты показали, что пизамин подавляет эту реакцию КоА.

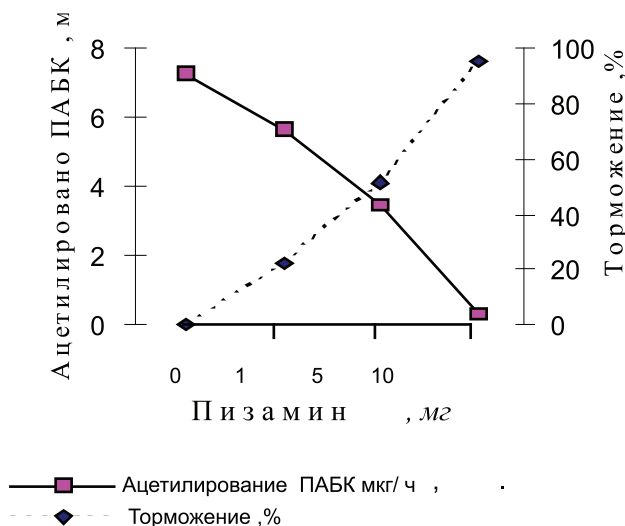


Рис. 1. Подавление пизамином ацетилирующей активност КоА

Как показано на графике рис. 1, пизамин подавляет процесс в классической форме зеркальной зависимости, указывая, что пизамин связан с этой реакцией, сильно подавляя процесс. Уже 1 мг пизамина в реакционной среде подавляет 6 мг КоА на 28,85%, 5 мг пизамина подавляет уже на 51,59 мг, а 10 мг – почти полностью подавляет реакцию. В количественном отношении это соответствовало ацетилированию ПАБК в контроле 7,23±0,35 мкг/час, а в опыте, соответственно, 3,5±0,31 и 0,35±0,0 мкг/ч.

Также как возрастающие концентрации пизамина усиливают подавление актив-

ности КоА, так и обратная реакция, возрастание концентрации КоА снижают подавляющее действие пизамина в другой специфической реакции, трансацетилирования КоА.

Так из данных табл. 1 видно, что возрастающие концентрации КоА, содержащиеся в реакционной среде, снижали подавляющее действие пизамина на реакцию транскарбоксиирования и образование эфира фосфотрансацетилазой, катализируемую КоА. Как видим, возрастающие концентрации КоА при стабильном содержании пизамина повышают активность

реакции, снижая % её подавления пизамином. Так 100 мкг КоА, содержащиеся в реакционной среде, снижали подавление

реакции пизамином до 43,5%, 200 мкг – до 33,0%, 300 мкг – до 23,0% и 400 мкг – до 18,0%

Таблица 1

Инактивация КоА подавляющего действия пизамина на реакции трансацетилирования

Содержание КоА, мг	Содержание пизамина, мг	% торможения реакции пизамином
100	5	48,5
200	5	33,0
300	5	23,0
400	5	18,0

Таким образом, проведенные исследования, убедительно свидетельствуют, что механизм действия пизамина из проростков гороха проявляется в антивитамином действии через ПК, подавляя биокаталитические функции её активного производного КоА. Следовательно, есть полное основание считать, что пизамин ингибитор КоА, т.е. его антикофермент.

Учитывая довольно широкий спектр реакций, катализируемых КоА (около 130) пизамин как его ингибитор может участвовать в подавлении большинства метаболических процессов.

Мы полагаем, что одним из таких процессов может быть процесс синтеза хлорофилла. Известно, что синтез хлорофилла имеет две фазы (темновая и световая), которые отличаются условиями и ходом реакций. В первой фазе происходит образование предшественников биохимическим путем

с участием КоА и не нуждаются в свете. Во второй фазе предшественник протохлорофиллид за счет световой энергии превращается в хлорофилл «а». Биохимический этап биосинтеза хлорофилла начинается с образования из сукцинил-КоА и глутамата или кетоглутарата первичного предшественника хлорофилла аминолевуленовой кислоты в присутствии АЛК-синтетазы (13)

Действие экзогенного пизамина на синтез хлорофилла изучали *in vitro*, на изолированных семядолях огурца (*Cucumis sativum* L) и кабачка (*Cucurbita pepo* L). Семена предварительно замачивали в дистиллированной воде на сутки, затем семядоли отделяли от кожуры и помещали в чашки Петри на водные растворы, содержащие 1; 2 и 3 мг/мл пизамина. Семядоли выдерживали в течение 3-х суток на непрерывном свете для синтеза хлорофилла.

Таблица 2

Подавление пизамином синтеза и накопления хлорофилла в изолированных семядолях огурца и кабачка

Пизамин мг/мл	Содержание хлорофилла, мг/ г сырого веса	
	Огурец	Кабачок
0	8,32 ± 0,25	12,32 ± 0,57
1	8,44 ± 0,32	8,52 ± 0,35
2	4,48 ± 0,15	8,44 ± 0,46
3	2,68 ± 0,11	6,72 ± 0,23

Как видим, повышение концентрации экзогенного пизамина в среде приводит к снижению содержания хлорофилла в изолированных семядолях огурца и кабачка (табл. 2) В этих опытах, несомненно также доказывается связь действия пизамина на биокаталитические функции КоА, т.е. проявляется антикоферментное действие пизамина.

На наш взгляд, интересным является то, что пизамин, оказывая подавляющее

влияние на формирование пигментной системы фотосинтетического аппарата, оказал влияние и на метаболические процессы фотосинтеза, подавляя фотосинтетическую активность. В литературе известно, что в листьях целого ряда высших растений: клевера белого, кукурузы, примулы, элодеи, а так же в клетках зеленых водорослей хлореллы, сценедесмуса, дуналиеллы обнаружено комплексное соединение железа с КоА. С участием такого железосодержащего

КоА происходит процесс фиксации CO₂ и её восстановление при фотосинтезе [4].

Поэтому нами было изучено влияние эндогенного пизамина на усвоение и накопления углерода в процессе фотосинтеза. Эта работа была проведена в сравнении с гомо ПК (гомопантотеновая кислота), природным аналогом ПК. Она является природным

конкурентным антагонистом ПК (11, 15), и способствует образованию неактивной формы КоА, а пизамин, по нашим данным, оказывает влияние на функции КоА. И в том, и в другом случае, испытанные антивитаминовые факторы ПК, оказали подавление продуктивности фотосинтеза, причем пизамин оказался намного активным (табл. 3).

Таблица 3

Влияние пизамина и гомоПК на усвоение и накопление углерода в процессе фотосинтеза в листьях фасоли

Вариант	С мг/ м ² /час.	% торможения
Контроль	0,304±0,011	0
Пизамин 300 мкг/ мл	0,049±0,003	83,8
ГомоПК 300 мкг / мл	0,173±0,007	43,1

Четко проявляется торможение эндогенным пизамином синтеза хлорофилла в 12-дневных проростков гороха в эпикотиле и 2-м междуузлиях, в которых он

максимально накапливается. Содержание хлорофилла в междуузлиях коррелирует с содержанием в них эндогенного пизамина (табл. 4)

Таблица 4

Влияние содержания эндогенного пизамина на накопление хлорофилла на свету в междуузлиях 12-дневные проростки гороха

Междуузлие	Содержание пизамина, мкг/г сухого веса	Содержание хлорофилла, мг/г сырого веса	Длина междуузлий, мм
Эпикотиль	66,7 ± 3	1,02±0,02	9,8±0,29
2-е междуузлие	56,7 ± 3	2,76±0,09	13,5±0,68
3-е междуузлие	11,0 ± 0,4	4,60±0,14	17,8±0,85
4-е междуузлие	5,8 ± 0,1	13,12±0,49	34,6±2,08

Высокое содержание эндогенного пизамина в двух нижних междуузлиях также резко подавляет их линейный рост и препятствует формированию на их узлах настоящих листьев, вместо которых образуются пластинки катафиллы. У этиолированных проростков с четырьмя междуузлиями после выставления на свет синтезе хлорофилла наблюдался хорошо в листьях и 2-х верхних междуузлиях, в эпикотиле и втором междуузлиях хлорофилл не обнаруживался.

Это ещё раз убедительно доказывает, что пизамин оказывает антивитаминовое действие на процессы, связанные с функциями КоА, через подавление метаболических процессов.

Таким образом, изучение антивитамина ПК из проростков гороха *Pisum sativum* L на процессы, с непосредственным участием активного производного пантотеновой кислоты КоА показало, что пизамин тормозит реакцию ацетилирования ПАБК, а возрастающие концентрации КоА вызывает тормо-

жение действия пизамин на реакции транс-ацетилирования. Пизамин подавляет синтез хлорофилла в изолированных семядолях огурца и кабачка. Инфильтрация раствора пизамина в первичные листья 14-дневных проростков фасоли пизамина и гомопантотеновой кислоты, конкурентного антивитамина ПК, вызывала подавление усвоение углерода в процессе фотосинтеза, причем пизамин был намного активнее. В проростках гороха *in vivo* содержание хлорофилла в междуузлиях коррелирует с содержанием в них эндогенного пизамина, который резко тормозит и линейный рост эпикотиля и второго междуузлия, препятствует образованию на их узлах настоящих листьев. У позеленевших этиолированных проростках гороха в эпикотиле и втором междуузлиях хлорофилл не обнаруживался.

Следовательно, по механизму антивитаминового действия пизамин в проростках гороха является природным ингибитором КоА, т. е. его антикоферментом.

Список литературы

1. Аликов Х.К. Фотоколориметрический метод определения углерода в листьях мокрым сжиганием в хромовой смеси. Методы комплексного изучения фотосинтеза. Вып. 2. Л., 1973. – С. 6-14.
2. Викторов Д.П. Малый практикум по физиологии растений: Учебное пособие для биол. спец. вузов. – 3-е изд., перераб. и доп. – М: Высшая школа, 1983. – 135 с., ил
3. Гусева А.Р., Борыхина А.Р. Определение КоА в высших растениях методом ацелирования амида сульфаниловой кислоты // Биохимия.– 1958. – Т. 23. – Вып. 2. – С. 291-295.
4. Зорин В.Э., Бойченко Е.А. Железосодержащий кофермент А в акцепторе углекислоты при фотосинтезе // Физиология растений.–1967.– Т. 14. –№ 5. – С. 843-848.
5. Мойсеенок А.Г. Пантотеновая кислота (биохимия и применение витамина).– Мн.: Наука и техника, 1980.– 264 с.
6. Смашевский Н.Д. Действие пизамина на дрожжевые организмы, синтезирующие и не синтезирующие пантотеновую кислоту // Биологические науки. – 1970. – № 12. – С. 87-91.
7. Смашевский Н.Д. Природный антивитамин пантотеновой кислоты в высшем растении как регулятор роста растений // Материалы конференции. Успехи современного естествознания,–2010. – № 12. – С. 90-92.
8. Смашевский Н.Д. Пизамин – антивитамин пантотеновой кислоты из *Pisum sativum* и его действия на дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* // Вопросы ботаники и физиологии растений. Хабаровский гос. пединститут. – Хабаровск. – 1965. – С. 3-16.
9. Смашевский Н.Д. Антивитаминное действие олигосахарида пизамина из проростков гороха / Фундаментальные исследования. – 2009. – №3.– С. 24-27.
10. Смашевский Н.Д. Олигосахарид проростков гороха (пизамин): антивитамин пантотеновой кислоты, регулятор роста растений. Автореф. дисс... д-ра с.-х. наук. – Астрахань, 2007. – 48 с.
11. Смашевский Н.Д. Копелевич В.М, Мариева Т.Д. и др. Антивитаминное действие D₂-DL-и L- гомопантотеновой кислоты на дрожжевые организмы // Прикладная биохимия и микробиология.–1973. – Т. IX. вып. 5. – С. 659-663.
12. Сыгинская О.Н. Модификация метода определения сульфаниламидов в приложении к исследованиям и содержания КоА и ацелирующей способности тканей // Вопросы мед. химии.–1956 – Т. 2. – № 33. – С. 214-221.
13. Тарчевский И.А. Основы фотосинтеза. М.: Высшая школа, 1977. 253 с., илл.
14. Mc Dongal D.B., Gargar R.V. Spectrophotometric Cycling Assay for Reduced Coenzyme A and Its Esters in Small Amounts // Anal. biochem, – 1979. – p.103-115.
15. Nishizawa G., Matsusaki F. The antagonistic action of homopantothenic acid against pantothenic acid // J. Vitaminol. – 1969. – V. 15. – № 1. – p. 8-25.