
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

ROLANDO BUDINI, STEFANO GIROTTI, GIOVANNI
NEGRONI

Complessi del piridossal-5'-fosfato con amine biogene

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 60 (1976), n.5, p. 644–651.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1976_8_60_5_644_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Chimica. — *Complessi del piridossal-5'-fosfato con amine biogene.* Nota di ROLANDO BUDINI, STEFANO GIROTTI e GIOVANNI NEGRONI, presentata (*) dal Socio G. SEMERANO.

SUMMARY. — Complexes between pyridoxal-5'-phosphate and different aminocompounds, some of which psychodrugs, have been studied.

The variations in the U.V. spectrum of pyridoxal-5'-phosphate are indicated and discussed. The equilibrium constants and the ΔG° of the reactions have been calculated and the kinetics of reactions has been followed. Except for nor-adrenaline and spermine, the behaviour of the aminocompounds is quite similar. Some biological implications are shown.

INTRODUZIONE

È ormai sufficientemente dimostrata l'importanza della funzione catalitica della Vitamina B₆ [1, 2] e numerose ricerche sono state condotte negli ultimi anni utilizzando sia enzimi B₆ dipendenti, sia la sola Vitamina nella sua forma attiva di Piridossal-5'-fosfato, nell'assunzione che, anche in assenza dell'apoenzima, il coenzima si comporti con modalità simili nei confronti del substrato [3-9].

D'altra parte, sono ben noti gli immino derivati per la reazione tra vitamina B₆ e aminoacidi, e la formazione di una base di Schiff viene considerata, in ogni caso, uno stadio obbligato nei processi enzimatici di decarbossilazione, transaminazione, isomerizzazione, tutti B₆ dipendenti [10-13].

Poiché è stato notato che alcune psicodroghe possono turbare queste reazioni enzimatiche [14-15], essendo tuttavia incerto il meccanismo della loro azione competitiva, ci è sembrato utile affrontare gradualmente il problema, studiando in una ricerca iniziale, la capacità di sostanze neuroattive di formare la base di Schiff. Inoltre, sono state prese in considerazione amine biologicamente attive, derivate dalla decarbossilazione di aminoacidi, e poliamine.

La presente Nota riporta dunque alcuni dati qualitativi e quantitativi relativi alla formazione di complessi tra PLP e aminoacidi, poliamine, e psicodroghe. Le analisi eseguite sono essenzialmente spettrofotometriche.

ESPERIMENTI

Sono stati usati: Piridossal-5'-fosfato (PLP), l-ornitina, putrescina, cadaverina, spermidina, spermina, l-idrossitriptofano, serotonina idrogeno ossalato, dl-noradrenalina (prod. Fluka); d-amfetamina solfato (Recordati); me-

(*) Nella seduta dell'8 maggio 1976.

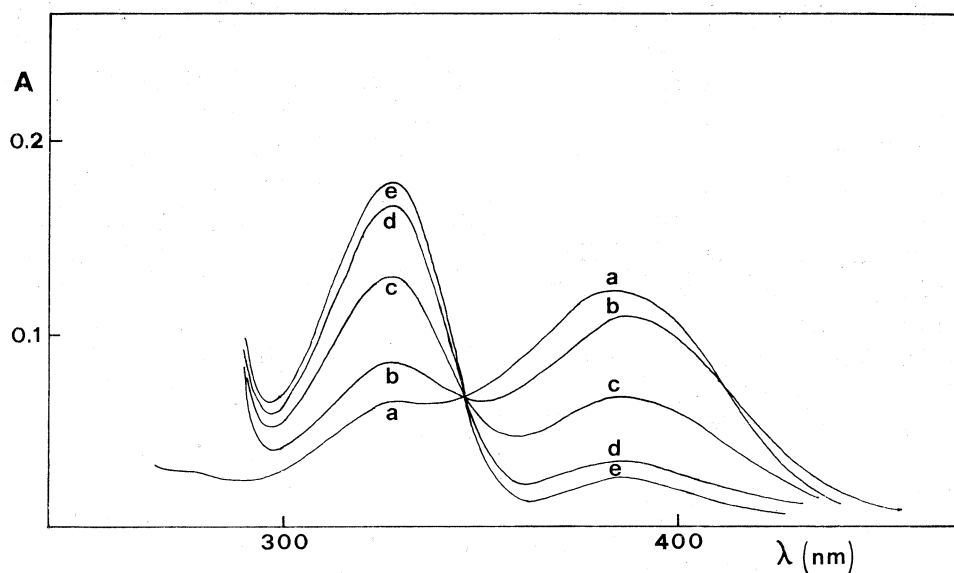


Fig. 1. - Reazione della noradrenalina $2 \cdot 10^{-3}$ M con PLP $2 \cdot 10^{-5}$ M; pH = 6; T = 25 °C. a) spettro di assorbimento del PLP. b, c, d, e) spettro di assorbimento del complesso rispettivamente dopo 5', 15', 30', 45'.

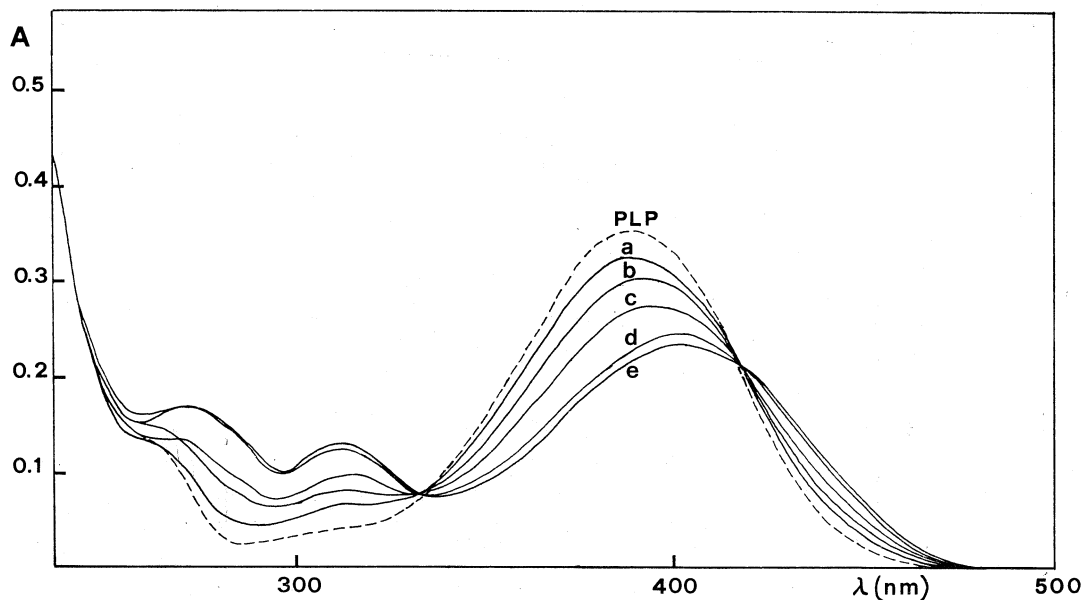


Fig. 2. - Reazione del PLP $5 \cdot 10^{-5}$ M con spermina a varie concentrazioni; pH = 9; T = 25 °C. a, b, c, d, e) spettri di assorbimento del complesso a diverse concentrazioni di spermina, rispettivamente $8 \cdot 10^{-5}$, $1.7 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $8 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} M.

scalina cloridrato (Sigma); tutti cromatograficamente puri. La concentrazione del PLP andava da $2 \cdot 10^{-5}$ a 10^{-4} M e il substrato da 10^{-2} a 10^{-4} M. Venivano eseguite, per le diverse concentrazioni, una serie di misure nell'intervallo di pH 0-12, usando Tamponi acetato, fosfato e carbonato. I valori estremi erano regolati con HCl e NaOH. La forza ionica era tenuta uguale a 1. Le soluzioni deaerate in corrente di azoto, erano incubate a 25°C e le determinazioni venivano eseguite al tempo zero e dopo ogni 5 minuti fino a raggiungimento dell'equilibrio usando uno spettrofotometro Perkin-Elmer 124 doppio raggio. Per mantenere la temperatura costante, si è impiegato un termostato Lauda K4R, mentre per le misure di pH si è usato un pH metro Knick. Viene riportato, come esempio, in fig. 1, lo spettro relativo alla soluzione PLP-noradrenalina, in funzione del tempo e a pH = 6, e in fig. 2 quello della spermina-PLP, in funzione della concentrazione e a pH = 9.

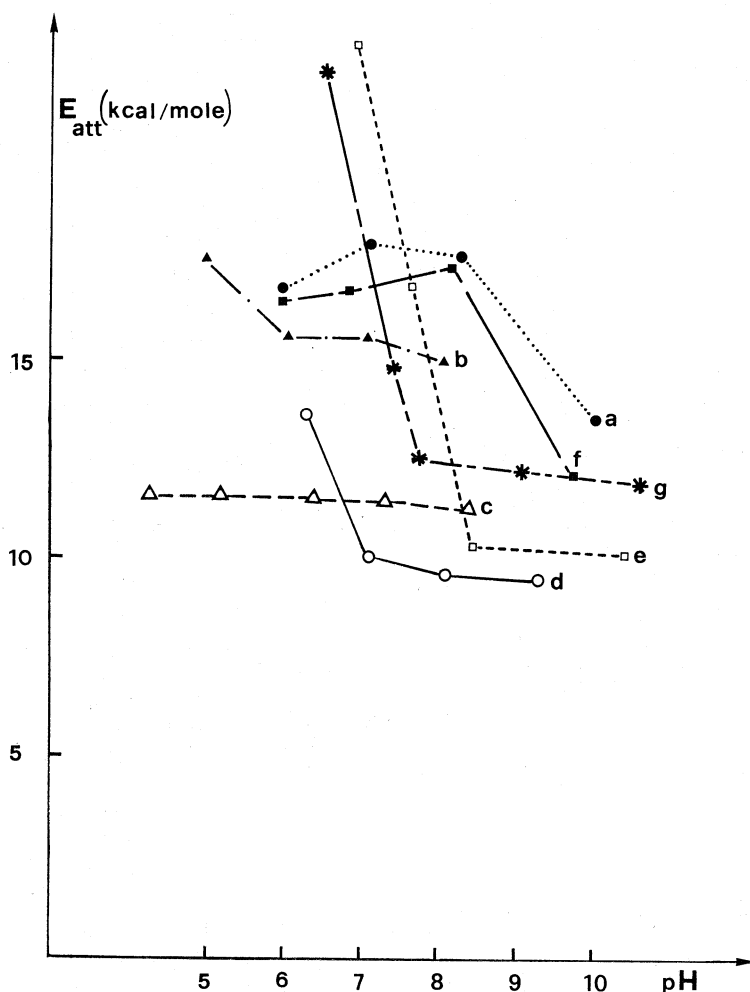


Fig. 3. - Influenza del pH sull'energia di attivazione per la reazione del PLP con: a) mescalina cloridrato, b) d-amfetamina solfato, c) serotonina idrogeno ossalato, d) dl-idrossitriptofano, e) putrescina, f) ornitina, g) cadaverina.

TABELLA I.

Costanti di equilibrio e ΔG° per la reazione del PLP con alcuni aminocomposti a 25 °C e a vari pH. Forza ionica = 1.

pH	4.0		5.0		6.0		7.0
COMPOSTI	$K_{eq} \cdot 10^{-4}$	ΔG° (Kcal/m)	$K_{eq} \cdot 10^{-4}$	ΔG° (Kcal/m)	$K_{eq} \cdot 10^{-4}$	ΔG° (Kcal/m)	$K_{eq} \cdot 10^{-4}$
l-ornitina cloridrato . . .	0.20 ± 0.03	-4.50 ± 0.04	0.30 ± 0.09	-4.74 ± 0.05	0.42 ± 0.03	-4.94 ± 0.04	2.81 ± 0.52
l-idrossi triptofano . . .	0.20 ± 0.05	-4.50 ± 0.05	0.24 ± 0.09	-4.61 ± 0.05	0.29 ± 0.02	-4.72 ± 0.05	0.94 ± 0.08
serotonina idrogenoossalato	0.08 ± 0.01	-3.96 ± 0.15	0.16 ± 0.01	-4.37 ± 0.04	0.78 ± 0.07	-5.31 ± 0.05	2.44 ± 0.23
d-amfetamina solfato. . .	0.03 ± 0.01	-3.38 ± 0.05	0.04 ± 0.01	-3.43 ± 0.05	0.15 ± 0.01	-4.33 ± 0.04	0.29 ± 0.03
mescalina cloridrato . . .	0.12 ± 0.02	-4.21 ± 0.10	0.20 ± 0.01	-4.52 ± 0.05	0.39 ± 0.02	-4.74 ± 0.05	2.05 ± 0.63
dl-noradrenalina . . .	4.09 ± 0.02	-6.29 ± 0.05	26.11 ± 0.09	-7.38 ± 0.05	26.32 ± 0.09	-7.44 ± 0.10	24.02 ± 0.54
cadaverina	0.10 ± 0.02	-4.09 ± 0.10	0.17 ± 0.01	-4.41 ± 0.03	0.29 ± 0.01	-4.72 ± 0.01	0.99 ± 0.04
putrescina	0.20 ± 0.05	-4.50 ± 0.05	0.24 ± 0.09	-4.61 ± 0.05	0.32 ± 0.02	-4.78 ± 0.01	1.10 ± 0.04
spermidina	0.28 ± 0.03	-4.70 ± 0.10	0.37 ± 0.03	-4.87 ± 0.80	0.42 ± 0.01	-4.94 ± 0.02	1.32 ± 0.05
spermina	—	—	—	—	—	—	—

pH	8.0		0.0		10.0	
COMPOSTI	$K_{eq} \cdot 10^{-4}$	ΔG° (Kcal/m)	$K_{eq} \cdot 10^{-4}$	ΔG° (Kcal/m)	$K_{eq} \cdot 10^{-4}$	ΔG° (Kcal/m)
l-ornitina cloridrato . . .	7.93 ± 0.51	-6.72 ± 0.13	5.23 ± 0.14	-6.43 ± 0.05	2.95 ± 0.52	-6.05 ± 0.06
l-idrossi triptofano . . .	8.92 ± 0.83	-6.74 ± 0.05	3.54 ± 0.31	-6.19 ± 0.06	2.33 ± 0.19	-5.94 ± 0.06
serotonina idrogenoossalato	3.52 ± 0.33	-6.19 ± 0.06	11.80 ± 0.91	-6.91 ± 0.05	10.08 ± 0.48	-6.82 ± 0.05
d-amfetamina solfato. . .	3.24 ± 0.33	-6.14 ± 0.06	7.90 ± 0.74	-6.67 ± 0.06	7.93 ± 0.25	-6.61 ± 0.09
mescalina cloridrato . . .	5.52 ± 0.34	-6.42 ± 0.08	3.31 ± 0.55	-6.16 ± 0.06	2.24 ± 0.57	-5.82 ± 0.17
dl-noradrenalina . . .	19.17 ± 0.86	-7.20 ± 0.06	—	—	—	—
cadaverina	2.58 ± 0.07	-6.02 ± 0.09	4.90 ± 0.20	-6.40 ± 0.06	4.20 ± 0.51	-6.31 ± 0.06
putrescina	1.98 ± 0.07	-5.84 ± 0.02	1.82 ± 0.02	-5.81 ± 0.09	1.02 ± 0.08	-5.47 ± 0.04
spermidina	2.52 ± 0.03	-6.00 ± 0.02	3.58 ± 0.06	-6.21 ± 0.02	0.13 ± 0.05	-5.59 ± 0.02
spermina	1.92 ± 0.03	-5.84 ± 0.02	5.39 ± 0.18	-6.42 ± 0.02	5.52 ± 0.21	-6.44 ± 0.02

Il PLP non combinato, era determinato colorimetricamente secondo Wada e Snell [16]. Dai dati spettrofotometrici, facendo anche uso della equazione di Benesi-Hildebrand-Fujimori [17], applicabile ai casi in cui un componente sia in grande eccesso, è stato possibile calcolare la costante di formazione degli imino derivati (per le misure eseguite a 25 °C, vedi Tabella I) e il ΔG° indicativo. Misure cinetiche sono state condotte nell'intervallo di pH 4-10; non è stato possibile effettuare misure ai pH estremi per la lentezza o eccessiva velocità della reazione. La temperatura variava da 15° a 40 °C. Si considerava il massimo a 420 nm, dove la formazione del complessi si rende particolarmente evidente. Non è stato possibile considerare invece il massimo a 275 nm perché mascherato, causa la notevole concentrazione delle amine.

I valori delle energie di attivazione in funzione del pH sono riportate in fig. 3.

RISULTATI

Sono, in questa ricerca iniziale, essenzialmente ottenuti da analisi spettrofotometriche nel visibile e nell'ultravioletto, i quali non consentono certamente di caratterizzare definitivamente la natura dei composti ottenuti, ma permettono tuttavia alcune interessanti considerazioni:

1) In conseguenza della interazione tra ornitina, mescalina, amfetamina, idrossitriptofano, serotonina, putrescina e piridossal-5'-fosfato, lo spettro del PLP viene perturbato e le variazioni indicano la presenza nella soluzione di un imino derivato (base di Schiff) con picchi caratteristici a 278 nm e 415-420 nm; quest'ultimo massimo può eventualmente slittare verso le maggiori o minori lunghezze d'onda in dipendenza del pH. Pur ritenendo possibile la formazione della base di Schiff a diversi pH, essa è particolarmente favorita da un ambiente debolmente alcalino. Infatti, se un pH debolmente acido potrebbe facilitare l'attacco nucleofilo sul carbonio carbonilico, mentre una eccessiva concentrazione di ioni idrogeno porterebbe alla protonazione della amina (inattiva), l'ambiente alcalino potrebbe favorire la reazione di disidratazione.

Ora un pH moderatamente basico può rappresentare un compromesso favorevole all'andamento della reazione. Con le sostanze dette, si formano con ogni probabilità comuni imino derivati; gli spettri in ogni caso depongono in questo senso.

Ad esempio, l'idrossitriptofano e la serotonina si comportano qualitativamente come il triptofano [18], benché la serotonina e in parte l'idrossitriptofano esplichino una maggiore capacità nel formare composti con il PLP (vedi Tabella I).

Le modificazioni strutturali del nucleo indolico e l'assenza del carbossile, agli effetti qualitativi del fenomeno, sembrano senza importanza. In condizioni ambientali di debole basicità, i valori della costante di equilibrio

raggiungono i valori più alti; si ricorda che tale costante è pochissimo influenzata dalla temperatura. Anche la velocità di reazione è generalmente favorita a questi valori di pH.

L'ornitina e la mescalina, pur così diverse strutturalmente, manifestano un comportamento simile. L'energia di attivazione della serotonina sembra indipendente dal pH. Occorreranno ulteriori indagini per chiarire tale comportamento.

2) In condizioni di notevole basicità, la nor-adrenalina si comporta come le sostanze sopra indicate, anche se il massimo sui 415-420 nm indicativo della formazione di legami di idrogeno intramolecolare [19] slitta verso le maggiori lunghezze d'onda. In condizioni di neutralità o a pH leggermente acido, lo spettro dell'associato PLP-noradrenalina si trasforma, e compare in funzione del tempo un nuovo picco a 320-325 nm. Gli altri gradualmente scompaiono.

Il nuovo massimo potrebbe essere emblematico di una forma ciclica dell'imino derivato della noradrenalina e la reazione decorrerebbe quasi irreversibilmente verso la formazione di questo composto notevolmente stabile. Tale forma ciclica è forse diversa da quelle esistenti per l'associazione tra triptofano (e derivati) e PLP; infatti con la noradrenalina si hanno caratteristiche modificazioni nello spettro del PLP, assenti negli altri casi. Benché i soli dati spettrofotometrici permettano di avanzare non più che una ipotesi, si potrebbe pensare alla formazione di un anello osazolidinico per la cui realizzazione è forse indispensabile il gruppo ossidrilico nella catena laterale della noradrenalina. La necessità di un ambiente debolmente acido favorisce l'attacco nucleofilo del gruppo aminico al carbonio carbonilico, nel quale la rottura del doppio legame è facilitata dalla presenza di ioni idrogeno; la successiva disidratazione non presenta eccessive difficoltà. Tuttavia è stato sperimentalmente osservato che il processo di disidratazione in ambiente acido, benché teoricamente possibile, avviene con tale lentezza da impedire analisi di natura cinetica (le sostanze si alterano). Comunque non meraviglia che nelle condizioni in cui la noradrenalina realizza la sua forma ciclica, si ottengono i valori più alti, in senso assoluto fra le sostanze da noi usate, della costante di formazione del complesso. Ciò starebbe a dimostrare la particolare stabilità del composto; altre forme cicliche (del triptofano e derivati, per esempio) forse qualitativamente diverse sembrerebbero meno stabili. Una eccezione si dovrebbe fare per la serotonina che sembra realizzare composti stabili ma in ambiente alcalino e di struttura probabilmente diversa.

3) Delle quattro poliamine usate, la putrescina forma comuni basi di Schiff, come l'ornitina, da cui deriva. In ambiente leggermente basico, sembra lievemente più stabile l'associato PLP-ornitina, ma l'associato PLP-putrescina è favorito cineticamente. I dati spettrofotometrici naturalmente non consentono di stabilire quale dei due gruppi aminici dell'ornitina partecipi alla reazione, tuttavia sembra più possibile la partecipazione del gruppo

aminico in alfa. La cadaverina con cinque gruppi metilenici (la putrescina ne ha quattro) deriva per decarbossilazione dalla lisina, e si comporta per certi aspetti in maniera simile alla putrescina e per altri anticipa le proprietà della spermidina e della spermina.

Queste poliamine a lunga catena con due gruppi aminici primari e uno (spermidina) o due (spermina) gruppi aminici secondari, sono sostanze biologicamente interessanti in relazione con i processi metabolici a carico del S.N.C. e alla sintesi delle basi puriniche e pirimidiniche e degli acidi nucleici. In ambiente acido il comportamento spettrofotometrico della spermina e della spermidina è simile e le due sostanze sembrano realizzare la solita base di Schiff.

Per la spermidina ciò è vero anche per pH debolmente basici. Ma in condizioni di forte basicità e per la spermina anche in ambiente neutro, lo spettro dell'associato manifesta un nuovo massimo a spese dei precedenti a circa 315 nm.

Questo massimo potrebbe indicare la formazione di un nuovo imino derivato oppure la ristrutturazione di quello inizialmente formato. La regione in cui il picco compare e le condizioni ambientali necessarie o utili alla sua estrinsecazione, potrebbero indicare l'esistenza di forme cicliche nelle quali il gruppo fenolico del PLP, ormai completamente ionizzato, non partecipa alla stabilizzazione della molecola. I gruppi aminici primari e secondari e la lunghezza della catena influenzano la formazione della forma ciclica.

Il complesso spermidina-PLP o spermina-PLP si forma ad altissima velocità, tale da non consentire misure cinetiche. Al contrario, la costante di equilibrio non è eccessivamente elevata; in ogni caso l'associazione è favorita in condizioni alcaline molto più drastiche di quelle ottimali per la formazione di imino derivati tradizionali.

In conclusione, si può osservare che nella reazione con il PLP, le sostanze da noi usate possono essere divise in tre gruppi. Un primo gruppo comprende: ornitina, mescalina, amfetamina, idrossitriptofano, serotonina, putrescina, e forma comuni basi di Schiff del tipo noto in letteratura e la reazione è favorita in condizioni di debole basicità. Un secondo gruppo comprende la noradrenalina che forma un imino derivato ciclico probabilmente di tipo diverso da quello ottenibile col triptofano e altri aminoacidi ed è favorito da condizioni debolmente acide. Un terzo gruppo rappresentato particolarmente da spermidina e spermina (e in parte cadaverina) che forma composti probabilmente di natura ancora diversa, i quali si formano velocemente e sono particolarmente stabili in condizioni di forte alcalinità. Misure ulteriori con tecniche diverse potranno dare ulteriori informazioni al riguardo.

Le sostanze usate presentano una notevole funzione biologica. Anche se le nostre condizioni sperimentali sono ben diverse da quelle naturali, e pur tenendo conto che i risultati ottenuti sono solo indicativi, la possibilità di reazioni *in vivo* fra esse e il PLP sembra evidente. I composti potreb-

bero rappresentare: 1) depositi transitori del PLP e amine negli associati meno stabili; 2) depositi non transitori di PLP e amine negli associati più stabili, con diminuita disponibilità per la cellula di queste sostanze. Se il composto aminico è una Psicodroga, si può intravedere una azione disintossicante del PLP.

BIBLIOGRAFIA

- [1] S. MOUDELES, R. KAPPELMAN e M. E. HANKA (1954) - « J. Biol. Chem. », 209, 397.
- [2] W. T. TENKINS e I. W. SIZEN (1960) - « J. Biol. Chem. », 235, 62.
- [3] D. A. METZLER e E. E. SNELL (1952) - « J. Am. Chem. Soc. », 74, 979.
- [4] D. E. METZLER e E. E. SNELL (1954) - « J. Am. Chem. Soc. », 79, 648.
- [5] D. E. METZLER (1956) - « J. Am. Chem. Soc. », 79, 485.
- [6] E. E. SNELL (1949) - « J. Am. Chem. Soc. », 67, 194.
- [7] D. E. METZLER, J. B. LONGENECKER e E. E. SNELL (1954) - « J. Am. Chem. Soc. », 76, 639.
- [8] D. E. METZLER, J. OLIVARD e E. E. SNELL (1954) - « J. Am. Chem. Soc. », 76, 644.
- [9] D. E. METZLER, M. IKAWA e E. E. SNELL (1954) - « J. Am. Chem. Soc. », 76, 648.
- [10] S. H. SNYDER, J. GLOWINSKI e J. AXELROD (1966) - « J. Pharm. exp. Therap. », 153, 8.
- [11] G. KANLSON, E. ROSENGREN e R. THUNBERG (1963) - « J. Physiol. », 169, 467.
- [12] R. BUDINI e B. BARBIROLI e A. M. MONTI (1975) - « IRCS », 3, 76.
- [13] R. BUDINI, B. BARBIROLI e A. M. MONTI (1975) « IRCS », 3, 77.
- [14] J. BLACK (1975) - « Biochem. Pharm. », 20, 924.
- [15] H. SATO e G. ZANNONI (1974) - « Biochem. Pharm. », 23, 3121.
- [16] H. WADA e E. E. SNELL (1961) - « J. Biol. Chem. », 236, 2089.
- [17] E. FUJIMORI (1959) - « Proc. Nat. Ac. Sc. », 45, 133.
- [18] CZ. MASLINSKI, D. KIERSKA e K. KLING (1972) - « Ann. Med. Sect. Pol. Acad. Sci. », 17, 167.
- [19] C. J. GRAY (1971) - *Enzyme-Catalysed Reactions*, Van Nostrand Reinhold, 283.