

К ВОПРОСУ ОБ УЧАСТИИ ОКСИПУРИНОВ В ОБМЕНЕ АДРЕНАЛИНА

Сообщение 3

Действие оксипуринов на окисление пирокатехина и адреналина в
присутствии фенолазы

Г. Х. БУНЯТЯН, В. Г. МХИТАРЯН и В. Б. ЕГИЯН

В предыдущих сообщениях нами было установлено, что на фосфатном буфере и на растворе Рингера окисление пирокатехина (1) и адреналина (2) подавляется мочевой кислотой при наличии меди.

Одним из ферментов, окисляющих полифенолы, в том числе адреналин и пирокатехин, является фенолаза, которая относится к медьсодержащим оксидазам и осуществляет переход полифенолов в соответствующие хиноны, что дает начало образованию из них пигментов, таннинов и т. д. Имея в виду, что мочевая кислота при наличии меди тормозит окисление пирокатехина и адреналина, мы заинтересовались вопросом: каково будет действие мочевой кислоты в присутствии фенолазы на процесс окисления вышеупомянутых веществ?

Учитывая широкое распространение метил-оксипуринов в растениях, обладающих высокой полифенолазной активностью (чай и др.), а также то обстоятельство, что в наших прежних исследованиях (3), позже и др. авторов (4), метил-оксипурины, в частности, теofilлин значительно тормозил окисление аскорбиновой кислоты при наличии меди, мы задались целью изучить действие кофеина, теобромина и теofilлина на окисление пирокатехина и адреналина фенолазой.

Экспериментальная часть

Опыты ставились с перекристаллизованным пирокатехином и аморфным адреналином на фосфатном буфере рН 7,6 (оптимум действия фенолазы рН 6—8). Их окисление учитывалось манометрически по количеству поглощенного кислорода в аппарате Варбурга при 40°.

В опытах брались: 0,5 мл раствора фенолазы и эквимольные количества по отношению к пирокатехину (0,04 м. мол.) мочевой кислоты (6,72 мг), кофеина (8,48 мг), теofilлина и теобромина (7,2 мг). Все производные пурина за исключением теобромина, брались в виде растворов, теобромин же из-за плохой растворимости его в буфере вносился в сосудик в виде навески.

В опытах с адреналином мы брали, как и в предыдущих, сосудик 3,6 мг адреналина в 0,5 мл буферного раствора. Объем опытной смеси доводился всегда фосфатным буфером до 3,1 мл. Во внутреннее отделение сосудика вносился 0,2 мл 30% раствора едкого калия.

Фенолазу мы получали из картофеля по прописи Сент-Дьердьи, описанной в работе Энгельгардта и Букина (5).

Раствор фенолазы, как правило, вносился всегда в отросток сосуда. Перед опытом в аппарате Варбурга определялась активность фенолазы, и по количеству поглощенного кислорода мы судили о ее активности, пользуясь в качестве окисляющего субстрата пирокатехином.

Перед погружением сосудиков в термостат в них пропусклся кислород в течение трех минут.

После регуляции давления в сосудах, через каждые 15 минут, производился отсчет поглощенного кислорода. Опыты с каждым веществом ставились одновременно

в трех сосудах, и каждая серия опытов повторялась два или три раза, после чего выводились средние данные.

Первые опыты были поставлены с пирокатехином. Полученные результаты без добавления фенолазы приведены на рис. 1.

Как видно из кривых рис. 1, на фосфатном буфере pH 7,6 один пирокатехин окисляется, поглощая в течение 30 минут 138 мл кислорода. Мочевая кислота почти вдвое тормозит процесс окисления. Подобное действие, но в меньшей степени, проявляют также кофеин, теобромин и теофиллин, причем из них кофеин, по сравнению с теоброминном и теофиллином, несколько сильнее тормозит окисление пирокатехина.

Результаты исследований,

полученных с добавлением фенолазы, приведены на рис. 2.

Кривые рис. 2 показывают, что мочевая кислота значительно тормозит окисление пирокатехина фенолазой, в особенности в течение первых 15 минут.

Кофеин, теобромин и теофиллин также проявляют тормозящий эффект в следующей последовательности: теобромин, кофеин, теофиллин.

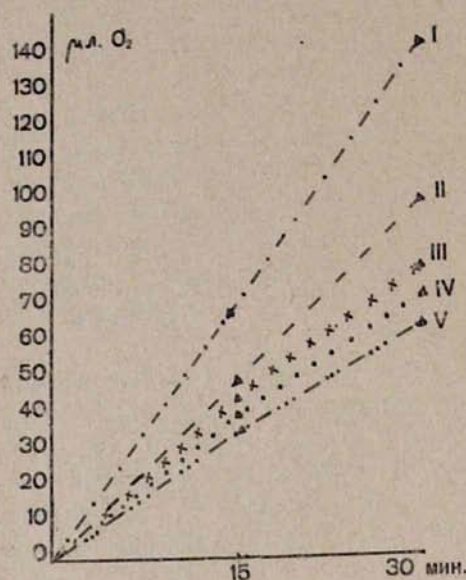


Рис. 1.

I	-----	Пирокатехин
II	-----	" + теофиллин
III	xxxxxxx	" + теобромин
IV		" + кофеин
V	- . - . - .	" + мочевая кислота

Об интенсивности окисления пирокатехина фенолазой и торможения этого процесса оксипурином мы судили также по интенсивности окраски опытной смеси.

При одной фенолазе получалась почти черная окраска, в присутствии же оксипуринов и фенолазы окраска бывала значительно слабее.

Полученные нами результаты представляют интерес в отношении ферментации чая. В кислородной фазе ферментации происходит окисление простейших дериватов дубильного комплекса полифенолов и катехинов в хиноны, затем в бескислородной фазе полученные о-хиноны уплотняются в окрашенные танины. Течение этих процессов имеет большое значение для качества чая. По данным Курсанова (6), в листьях чая, в особенности молодых, количество свободных полифенолов достигает до 46% от общего количества дубильных веществ. Окисление полифенолов при ферментации чая осуществляется пероксидазной системой, что было обосновано работами Опарина и Курсанова, Манской, а также и полифенолоксидазой. Последний фермент хорошо был изучен Sreerangachar (7), он обосновал его важную роль в ферментации чая. Полученный им фермент из чая при помощи ацетона окислял пирокатехин лучше, по сравнению с чайным танином. Обнаруженное нами поведение метил-оксипуринов при окислении пирокатехина

фенолазой говорит о возможности их роли в ферментации чая, если учесть, что количество кофеина в чае достигает от 1,5%—4% на сухой вес, т. е. гораздо больше, чем имелось в наших опытах (0,23—0,27%), то эта возможность становится более вероятной.

С другой стороны, известно, что аскорбиновая кислота, которой богат чайный лист, редуцирует образовавшиеся хиноны в полифенолы, задерживая образование танинов. По исследованиям Робертса (8), добавление аскорбиновой кислоты задерживает образование танинов и чайный лист сохраняет свою зеленую окраску, пока аскорбиновая кислота полностью не окисляется, что и происходит в самом начале ферментации.

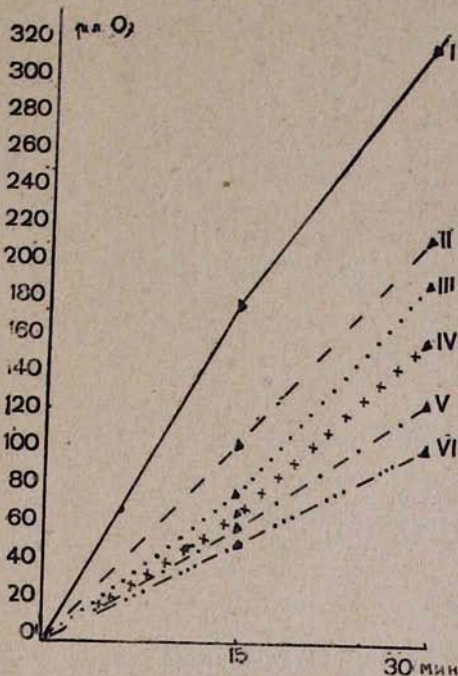


Рис. 2.

I — — —	Пирокатехин + фенолаза
II — — —	" + " + теофиллин
III . . .	" + " + кофеин
IV ××××	" + " + теобромин
V . . .	" + " + мочевая кислота
VI . . .	" + " + мочевая кислота

чая. По количеству окисленной аскорбиновой кислоты можно судить об активности полифенолоксидазы (9). Как показали наши многочисленные исследования, оксипурины сильно тормозят окисление аскорбиновой кислоты (3, 10), и это свойство они проявляют и при наличии перекиси водорода (11). Все вышесказанное побуждает нас изучить значение метил-оксипуринов в процессе ферментации чая, в особенности в начале окислительной фазы, еще до образования высокомолекулярных танинов, с которыми связывается часть кофеина.

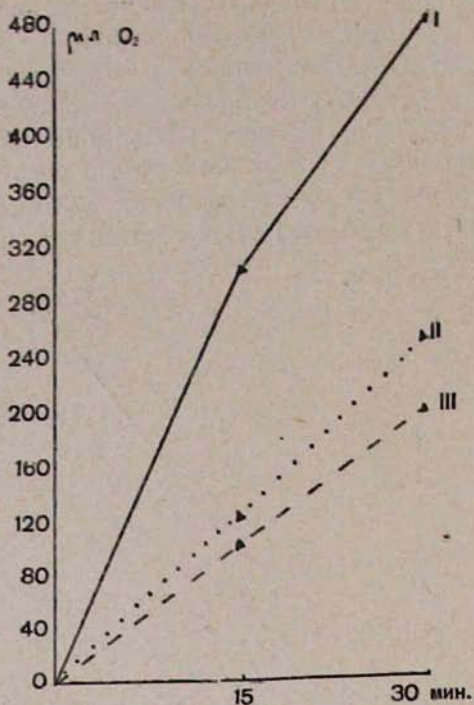


Рис. 3.

I — — — — — адrenalин + фенолаза
 II " + " + мочевая кислота
 III — — — — — адrenalин

Следующие опыты были поставлены с адrenalалином. Результаты опытов приведены на рис. 3.

Из кривых рис. 3 видно, что окисление адrenalалина значительно ускоряется фенолазой, а мочевая кислота оказывает весьма заметное тормозящее действие. Полученные результаты с фенолазой еще больше подтверждают наше мнение о значении оксипуринов в превращениях адrenalалина в организме.

Тормозящее действие оксипуринов при окислении пирокатехина и адrenalалина в присутствии меди мы объясняли связыванием ее с оксипурином и, тем самым, понижением окислительного потенциала меди. Как объяснить подобное действие оксипуринов на фенолазу, вопрос этот является предметом дальнейших исследований.

Выводы

1. Мочевая кислота задерживает окисление пирокатехина и адrenalалина в присутствии фенолазы.
2. Теофиллин, кофеин, теобромин оказывают тормозящее действие на окисление пирокатехина фенолазой в следующей последовательности: теобромин, кофеин, теофиллин.

1. Бунятян Г. Х. и В. Г. Мхитарян—Известия АН Арм. ССР, № 4, 89, 1947.
2. Бунятян Г. Х. и В. Г. Мхитарян—Научные труды Ин-та физиологии АН Арм. ССР, I, 49, 1948.
3. Бунятян Г. Х. и В. Г. Мхитарян—Известия АрмФАН, № 4—5, 251, 1948.
4. Giri K. V. a. P. V. Krishnumurthy—Nature, 147, 59, 1941.
5. Энгельгард В. А. и В. Н. Букин—Биохимия, 2, 274, 1937.
6. Курсанов А. Л.—Биохимия, 6, 312, 1941.
7. Sreerangachar H. B.—Bioch. J., 37, 656, 661, 667, 1943.
8. Roberts E. A. H.—Bioch. J., 33, 842, 1943.
9. Sreerangachar H. B.—Bioch., J. 37, 653, 1943.
10. Бунятян Г. Х.—Труды Всесоюзной Витаминной Конференции, 68, 1940; Биохимия, 6, 155, 1941.
11. Бунятян Г. Х., В. Г. Мхитарян и В. Б. Егиан.—Научные труды Ин-та физиологии АН Арм. ССР, I, 59, 1948.

ՕՔՍԻՊՈՒՐԻՆՆԵՐԻ ՄԱՍՆԱԿՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱԴՐԵՆԱԼԻՆԻ
ՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՄԷՋ

III. ՕՔՍԻՊՈՒՐԻՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՊԻՐՈԿԱՏԵԽՆԻԷԻ ԵՎ
ԱԴՐԵՆԱԼԻՆԻ ՕՔՍԻԴԱՑՄԱՆ ՎՐԱ ՖԵՆՈԼԱԶԱՅԻ ՆԵՐԿԱՑՈՒԹՅԱՄԲ

Հ. Խ. ԲՈՒՆՅԱՆ, Վ. Գ. ՄԽԻՐԱՆ ԵՎ Վ. Բ. ԵԳԻԱՆ

Ա Մ Փ Ո Փ Ո Ւ Մ

Անցյալ հազարամյակներում (1,2) մեր կողմից ցույց էր տրված, որ մի-
զաթթուն արգելակում է պիրոկատեխինի և ադրենալինի օքսիդացումը
պղնձի առկայությամբ ֆոսֆատային բուֆերում և Ռինդերի լուծույթի մեջ:
Տվյալ աշխատության մեջ մենք մեր առաջ խնդիր դրեցինք պարզե-
լու, թե ինչպես կազդի միզաթթուն ադրենալինի և պիրոկատեխինի օքսի-
դացման վրա ֆենոլազայի ներկայությամբ, վերջինս ինչպես գիտենք հան-
դիսանում է պղնձ պարունակող ֆերմենտ և արագությամբ օքսիդացնում
պոլիֆենոլները: Մեզ համար հետաքրքրական էր պարզելու նաև մեթիլ-
օքսիպուրինների (կոֆեին, թեոֆիլին և թեոբրոմին) ազդեցությունը վե-
ստերոլայն հյուսվածքի օքսիդացման վրա, քանի որ նրանք բավականին տա-
րածված են մի շարք բույսերում (թեյ և այլն), որոնք ունեն ուժեղ ար-
տահայտված պոլիֆենոլազային հատկություն:

Այդ ուղղությամբ դրված փորձերը ցույց տվին.

1. Միզաթթուն արգելակում է պիրոկատեխինի և ադրենալինի օքսի-
դացումը ֆենոլազայի առկայությամբ, 2. թեոֆիլինը, կոֆեինը և թեո-
բրոմինը նույնպես արգելակում են պիրոկատեխինի և ադրենալինի օքսի-
դացումը ֆենոլազայով, սրանցից ավելի ուժեղ արգելակող ազդեցություն
հանդես բերում թեոբրոմինը, ապա կոֆեինը և թեոֆիլինը:

Ստացված տվյալները կարևոր են օքսիպուրինների և մեթիլ-օքսի-
պուրինների դերը կենդանական օրգանիզմներում, ադրենալինի փոխանա-
խության մեջ պարզաբանելու համար, իսկ բուսական օրգանիզմում նրանք
սլշանակություն են ստանում պոլիֆենոլների ձևափոխումների մեջ, կապ-
ված նրանց օքսիդացման հետ:

