

1 9 4 7

I

К вопросу об участии оксипуринов в обмене адреналина

2 - о е с о о б щ е н и е

Действие мочевой кислоты на окисление адреналина

Бунятян Г. Х. и Мхитарян В. Г.

Несмотря на большое количество исследований, посвященных адреналину, все же многие превращения его в организме и механизм их остается невыясненным. Значительный интерес представляют вопросы инактивации и стабилизации адреналина в организме, ибо эти моменты имеют большое значение в физиологическом действии адреналина и в его участии в обмене веществ (1,2). В инактивации адреналина придается значение его окислению при участии соответствующих ферментов. Адреналин подвергается окислительному дезаминированию под действием адреналин-оксидазы (тираминазы), превращаясь в соответствующий альдегид и метиламин в основном в печени и тонком отделе кишок. Под действием цитохромной системы и полифенолоксидазы окисляется пирокатехиновое кольцо адреналина, ведущее к образованию адrenoхрома и меланиновых пигментов. Alles и сотрудники (3) не придают особенного значения инактивированию адреналина путем его окисления тирозиназой, так как последняя не имеется в крови и тканях в достаточном количестве. В инактивации адреналина имеет существенное значение эстерификация его фенольного кольца с серной кислотой при действии фермента сульфосинтазы в печени. По исследованиям Torda кокаин усиливает действие адреналина *in vivo*, ингибируя действие вышеупомянутого фермента (4).

В стабилизации адреналина в организме придается значение аминокислотам (5) глутатиону и аскорбиновой кислоте (6), последние восстанавливают окисленный (ортохинон) адреналин. В литературе имеются указания, что адреналин в определенных условиях подавляет окисление аскорбиновой кислоты (7), в наших прежних иссле-

дованиях мы также отмечали, что дифенолы и адреналин переводят дегидроаскорбиновую кислоту в аскорбиновую, тем самым способствует стабилизации аскорбиновой кислоты. Роль аскорбиновой кислоты в стабилизации адреналина нуждается в дальнейшей проверке, т. к. в литературе по этому поводу встречаются разноречивые данные. Интересно отметить, что при скорбуге у морских свинок количество адреналина в надпочечниках (8, 9) значительно увеличивается.

С другой стороны, по исследованиям Тульчинской (10) инъекция адреналина вызывает падение содержания аскорбиновой кислоты в надпочечниках и повышает ее количество в слизистой оболочке кишечника, в печени и почках. По нашим исследованиям инъекция адреналина значительно повышает экскрецию аскорбиновой кислоты (11). Все это не говорит в пользу стабилизации адреналина аскорбиновой кислотой, в особенности в надпочечниках.

Между поведением аскорбиновой кислоты и адреналина есть много общего. Как показали исследования Сцент-Гьорги пирокатехин, входящий в состав адреналина и аскорбиновая кислота выявляют одинаковые свойства в процессах аутоокислации (12). Имея в виду вышеизложенное, мы заинтересовались вопросом: как действуют оксипурины, которые в наших исследованиях сильно тормозили окисление аскорбиновой кислоты, на окисление адреналина.

С 1938 г. работая над изучением действия оксипуринов (гипоксантин, ксантин и мочевая кислота) на окисление аскорбиновой кислоты, мы установили, что они на фосфатном буфере при различных рН, на растворе Рингера, а также при наличии тканевых срезов, значительно тормозят окисление аскорбиновой кислоты при наличии меди (13, 14, 15, 16). Это свойство оксипуринов наблюдалось и в присутствии железа, хотя в меньшей степени.

Начиная с 1941 года, результаты наших исследований были подтверждены Giri и Krishnamurthy (17, 18, 19) Ribeiro и Bonoldi (20, 21) и другими. Изучая действие мочевой кислоты на окисление пирокатехина на фосфатном буфере (рН 6,5 и 7,4) и на растворе Рингера мы установили, что она, как сама по себе, так и в присутствии меди и железа оказывает тормозящее действие на процесс окисления пирокатехина (22). Установив вышеупомянутые действия оксипуринов при окислении пирокатехина, мы задались целью выяснить их влияние на окисление адреналина при различных условиях, имея в виду, что вопрос стабилизации адреналина в организме не совсем еще выяснен.

В настоящей работе приводятся результаты исследований, проведенных с адреналином для выяснения действия мочевой кислоты на его окисление в присутствии железа и меди, на фосфатном буфере и на растворе Рингера.

Экспериментальная часть

В наших опытах мы пользовались кристаллическим адреналином.

Опыты ставились на М/15 фосфатном буфере при рН 6,53 и 7,4 и на растворе Рингера.

Окисление адреналина учитывалось манометрически по поглощению кислорода в варбурговских респирометрах при 40°. Средние полученные величины поглощенного кислорода выводились через каждые 15 минут, в течение одного часа.

В виду плохой растворимости адреналина как в фосфатном буфере, так и в растворе Рингера, нам приходилось готовить раствор адреналина следующим образом: на торсионных весах взвешивалось 25,2 мг адреналина, растворялось в 1,4 мл $\frac{N}{10}$ HCl, нейтра-

лизовалось $\frac{N}{10}$ NaOH до нейтральной реакции—рН 7,0 и добавлялось фосфатного буфера или раствора Рингера до объема 3,5 мл. Из этого раствора бралось в наших опытах всегда по 0,5 мл, содержащий 3,6 мг адреналина и, как правило, помещалось в остросток сосуда. В сосудик же вносилось 1,4 мл раствора мочевой кислоты в буферной смеси с содержанием 3 мг мочевой кислоты. В опытах на растворе Рингера, в виду плохой растворимости мочевой кислоты в нем, бралась она в виде навески—3 мг.

Общий объем жидкости в сосудах доводился до 3,1 мл или фосфатным буфером или раствором Рингера. Во внутреннее отделение сосуда вносилось 0,2 мл едкого калия (30%).

Таким образом, общее количество жидкости в сосудах Варбурга каждый раз составляло 3,3 мл.

В опытах с ионами меди и железа мы применяли их сульфаты. На 3,1 мл жидкости прибавлялось по 0,02 мл водного раствора CuSO_4 в количестве 0,47 μ мол. и по 0,063 мл водного раствора FeSO_4 в количестве 5,3 μ мол. Перед погружением сосудаков в термостат, в них пропускали кислород в течение трех минут. Отрегулировав обычным способом в термостате давление внутри сосуда, манометр с сосудаком вынимался из термостата, содержимое остротка (раствор адреналина) быстро переливался в сосудик и снова погружался в термостат. Затем, повторно отрегулировав давление в сосудаке через определенные промежутки времени, производился отсчет поглощаемого кислорода.

Опыты ставились с каждым веществом одновременно в трех сосудах и, как правило, каждая серия повторялась два или три раза.

В таблице приведены средние данные из 6—9 опытов величины поглощенного кислорода.

Результаты исследований, проведенных на фосфатном буфере рН 7,41 приведены в таблице 1.

Таблица 1

Фосфатный буфер pH 7,41

Фосфатный буфер pH 7,4					
	Взятые вещества	Время мин.			
		15'	30'	45'	60'
		Количество поглощенного кислорода в мл			
I	Адреналин	90	213	330	433
II	Адреналин + мочевая кислота	53	131	218	292
III	Адреналин + Fe	202	369	518	627
IV	Адреналин + Fe + Мочевая кислота	141	277	401	511
V	Адреналин + Cu	152	341	523	653
VI	Адреналин + Cu + Мочевая кислота	117	275	428	548

Как показывает приведенная таблица, адреналин сам на фосфатном буфере при pH 7,41 довольно хорошо окисляется, поглощая значительные количества кислорода, в течение одного часа—433,99 мл. Железо и медь значительно способствуют окислению адреналина. При них количество поглощенного кислорода, в различные периоды времени, примерно от 1,5—2,0 раз больше по сравнению с одним адреналином.

Из таблицы I видно, что мочевая кислота сама по себе тормозит окисление адреналина, это свойство ее выявляется, как при наличии железа, так и при меди.

Результаты исследований, проведенных на фосфатном буфере pH 6,53 приведены в таблице 2.

Таблица 2

Фосфатный буфер pH 6,53

	Взятые вещества	Время мин.			
		15'	30'	45'	60'
		Количество поглощенного кислоро- да в мл			
I	Адреналин	14	32	60	85
II	Адреналин + Мочевая кислота	8	16	37	56
III	Адреналин + Fe	22	63	98	147
IV	Адреналин + Fe + Мочев. кисл.	8	26	44	73
V	Адреналин + Cu	120	231	327	404
VI	Адреналин + Cu + Мочевая кислота	38	82	130	184

Из этой таблицы ясно видно, что окисление адреналина при рН 6,53 идет несравненно медленнее (примерно от 5—6 раз), чем при рН 7,41. Железо при рН 7,41, так и при рН 6,53 повышает поглощение кислорода в различные периоды времени от 1,5—2,0 раз, по сравнению с одним адреналином, но при рН 6,53 в обоих случаях кислород поглощается гораздо меньше, чем при рН 7,41. Что же касается меди, то как видно из таблицы, она, по сравнению с одним адреналином, повышает поглощение кислорода от 5—7 раз, а между тем, как при рН 7,41 она ускоряет процесс окисления до 1,5 раз. В опытах с пирокатехином мы также наблюдали при рН 6,5 (222) подобное действие меди.

Мочевая кислота при рН 6,53 как сама по себе, так и в присутствии железа и, в особенности, меди, значительно тормозит окисление адреналина. При рН 6,53 она как антиоксидант действует значительно сильнее, чем при рН 7,41.

Результаты исследований, проведенных на растворе Рингера приведены в таблице 3.

Таблица 3.

Рингер

	Ваемые вещества	Время мин.			
		15'	30'	45'	60'
		Количество поглощенного кислорода в мл			
I	Адреналин	131	255	316	359
II	Адреналин + Мочевая кислота	22	32	36	41
III	Адреналин + Fe	36	42	53	57
IV	Адреналин + Fe + Мочев. кисл.	62	79	120	142
V	Адреналин + Cu	220	306	342	362
VI	Адреналин + Cu + Мочев. кисл.	42	72	91	109

Как видно из таблицы 3 окисление самого адреналина идет хорошо на растворе Рингера. Самое интересное тут заключается в том, что железо не только не способствует окислению адреналина, но наоборот задерживает его в значительной степени. Подобное явление мы наблюдали и при окислении пирокатехина на растворе Рингера, хотя в этом случае железо несравненно меньше задерживало окисление пирокатехина по сравнению с окислением адреналина. При наличии меди, на растворе Рингера окисление адреналина ускоряется в меньшей степени, чем на фосфатном буфере при рН 7,41 и в особенности—рН 6,53.

Мочевая кислота сама по себе полностью подавляет окисление

адреналина, ибо одна мочева́я кислота на растворе Рингера без адреналина поглощала примерно такое же количество кислорода. В первом сообщении (22) нами было показано, что одна мочева́я кислота на растворе Рингера в различные периоды времени поглощает от 39—49 μ л кислорода, причем, железо и медь не ускоряли ее окисление. На фосфатном буфере мочева́я кислота, как сама по себе, так и при наличии меди, не окислялась.

Интересно отметить, что мочева́я кислота на растворе Рингера при наличии железа не только не способствует сохранению адреналина, но, наоборот, ускоряет его окисление по сравнению с одним железом. Но при сочетании мочево́й кислоты с железом окисление идет медленнее, по сравнению с одним адреналином. Подобного действия мочево́й кислоты мы не наблюдали при окислении пирокатехина. В этом случае она задерживала окисление пирокатехина на растворе Рингера при наличии железа.

Как показывает таблица 3, мочева́я кислота на растворе Рингера сильно тормозит окисление адреналина при наличии меди.

Таким образом, мочева́я кислота на фосфатном буфере как сама по себе, так и в присутствии железа и меди способствует сохранению адреналина. Это его свойство особенно хорошо выражено при pH 6,53 в присутствии меди. На растворе Рингера одна мочева́я кислота сильно тормозит окисление адреналина, она выявляет сильное антиоксидантное свойство и при наличии меди.

Любопытные результаты получились с железом и мочево́й кислотой на растворе Рингера. Одно железо не только не ускоряет окисление адреналина, но даже довольно сильно тормозит его, а мочева́я кислота с железом ускоряет процесс окисления адреналина. Подобное явление мы наблюдали и при окислении аскорбиновой кислоты (16). Мочева́я кислота при наличии железа на фосфатном буфере тормозила окисление аскорбиновой кислоты, но на растворе Рингера, наоборот, ускоряла его.

Антиоксидантное действие оксипуринов-мочево́й кислоты мы не объясняем только тем, что они связывают медь и железо, лишая их своего каталитического действия. Предварительные опыты, поставленные с дегидроаскорбиновой кислотой говорят о том, что оксипурины в определенных условиях могут восстанавливать дегидроаскорбиновую кислоту в аскорбиновую. Что же касается того странного поведения железа и мочево́й кислоты на растворе Рингера, то наши сведения пока недостаточны для объяснения этого вопроса.

Вообще, работая с медью и оксипуринами мы всегда получали определенные закономерности. Этого мы не можем сказать на счет железа. При окислении аскорбиновой кислоты, пирокатехина и адреналина при наличии железа и оксипуринов, мы часто получали разноречивые, порой непонятные результаты, что говорит о разном механизме действия меди и железа при окислении вышеупомянутых веществ. Исследования в этом направлении в процессе разработки.

На основании наших исследований можно рекомендовать оксипурины для стабилизации растворов адреналина. Что же касается роли оксипуринов в стабилизации адреналина в организме, то это станет ясным после исследований с различными ферментативными системами и опытами *in vivo*, которые нами начаты.

В ы в о д ы

1. Мочевая кислота на фосфатном буфере (рН 6,53 и 7,41) и в особенности на растворе Рингера тормозит окисление адреналина.

2. Мочевая кислота проявляет антиоксидатное действие на окисление адреналина при наличии меди. Это его свойство особенно хорошо проявляется на фосфатном буфере рН 6,53 и на растворе Рингера.

3. Мочевая кислота является антиоксидантом и при наличии железа только на фосфатном буфере. На растворе Рингера она сочетаясь с железом ускоряет процесс окисления адреналина по сравнению с одним железом.

4. Железо и медь на фосфатном буфере при рН 7,41 почти одинаково ускоряют окисление адреналина. При рН 6,53, медь сильнее железа способствуют окислению адреналина. Медь ускоряет окислительный процесс и на растворе Рингера, железо, наоборот, сильно подавляет его. Сочетаясь с мочевой кислотой железо на растворе Рингера ускоряет окисление адреналина.

ՕՋՍԻՊՈՒՐԻՆՆԵՐԻ ԴԵՐԸ ԸԴՐԵՆԸԼԻՆԻ ՓԵՎՊԸՆՄԸՆ ՄԵՋ

2-ՐԴ ՀԱՂՈՐԴՈՒՄ

Միգաթթվի ազդեցությամբ ադրենալինի օքսիդացման վրա

Ռուսյարյան Հ. Խ. և Վ Մխիթարյան Վ. Գ.

ԱՄՓՈՓՈՒՄ

1. Միգաթթուն փոսֆատային ըուֆերում (pH 6,53 և 7,41) և մանավանդ Ռինգերի լուծույթում արգելակում է ադրենալինի օքսիդացումը:

2. Միգաթթուն ցուցաբերում է անտիօքսիդանտային հատկության պղնձի առկայությամբ, արգելակելով ադրենալինի օքսիդացումը հատկապես փոսֆատային ըուֆերում pH — 6,53 և Ռինգերի լուծույթում:

3. Միգաթթուն անդիօքսիդանտ է հանդիսանում նաև երկաթի առկայությամբ, բայց միայն փոսֆատային ըուֆերում, Ռինգերի լուծույթում համակցվելով երկաթի հետ, նա ավելի է արագացնում ադրենալինի օքսիդացումը:

4. Երկաթը և պղինձը փոսֆատային ըուֆերում pH —7,41 համարյա հավասար չափով են արագացնում ադրենալինի օքսիդացումը:

pH 6,53-ում պղինձը՝ երկաթի համեմատությամբ շատ ավելի մեծ չափով է արագացնում օքսիդացման պրոցեսը: Պղինձը արագացնում է ադրենալինի օքսիդացումը և Ռինգերի լուծույթում, իսկ երկաթն ընդհակառակը՝ արգելակում է այն: Երկաթն համակցվելով միգաթթվի հետ Ռինգերի լուծույթում նպաստում է ադրենալինի օքսիդացմանը:

ЛИТЕРАТУРА

1. Утевский А. М., Биохимия адреналина, 1939.
2. " " Усп. соврем. биологии, 18, 145, 1914.
3. Alles G. A., Blohm C. L. ac Saunders P. R., J. Biol Chem., 144, 757, 1942.
4. Torda C., J. Pharmacol a. Exper. Therap., 77, 274, 1943.
5. Wiltshire, J. Physiol., 72, 88, 1931.
6. Heard R. D. H. a. Welc A. Dem., Biochem. J., 29, 988, 1935.
7. Yamamoto M., Z. physiol Chem., 243, 266, 1936.
8. Banerjee S., J. Biol. Chem., 159, 327, 1945.
9. Banerjee S. a. Chosh N. Ch., J Biol. Chem., 166, 25, 1946.
10. Тульчинская Е. З., Новое в науке и технике витаминов, вып 1, 39, 1946.
11. Бунятян Г. Х. и Матинян Г. В. в печати.—
12. Сцент—Гьюргеи А., Усп. соврем. биологии, 9, 374, 1938.
13. Бунятян Г. Х., Труды Всесоюзной Конференции по Витаминам, стр.—
68, 1940 Москва-Ленинград.
14. Бунятян Г. Х. и Мхитарян В. Г., Известия Армфана, № 4—5,
251, 1940.
15. Бунятян Г. Х., Биохимия, 6, 155, 1941.
16. Бунятян Г. Х., Известия Армфана, №1—2, 77, 1942.
17. Giri K. V. a. Krishnamurthy P. V., Nature, 147, 59, 1941.
18. Giri K. V., Biol Abstr., 17, 1657, 1943.
19. Giri K. V. a. Seshagiri Rao P., Proc. Ind. Acad. of Sci., 24, B. 264, 1946.
20. Ribeiro D. F. a. Bonoldi V., Chem. Abstr., 38, 6387, 1944.
21. Bonoldi V., Ribeiro R. F. a. Ribeiro O. F., Chem. Abstr., 39, 2773, 1945.
22. Бунятян Г. Х. и Мхитарян В. Г., Известия АН Арм. ССР, 4,
89, 1947.

