ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՌ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱՅԻ ԶԵԿՈՒՅՑՆԵՐ
ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР
X 1949 4

БИОХИМИЯ

Г. Х. Буниатян, действ. чл. АН Армянской ССР, В. Г. Мхитарян и В. Б. Егиян

К вопросу об участии оксипуринов в обмене адреналина. III. Действие оксипуринов на окисление пирокатехина и адреналина в присутствии фенолазы

(Представлено 15 VI 1949)

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, теофиллин значительно тормозили окисление аскорбиновой кислоты при наличии меди, мы задались целью изучить действие кофеина, теобромина и теофиллина на окисление пирокатехина и адреналина фенолазой.

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

В опытах брались: 0,5 *мл* раствора пирокатехина 4,4 *мг* (0,04 *м/мол*), 0,5 *мл* раствора фенолазы и эквимолярные количества по отношению к пирокатехину (0,04 *м/мол*), мочевой кислоты (6,72 *мг*), кофеина (8,48 *мг*), теофиллина и теобромина (по 7,2 *мг*). Все производные пурина за исключением теобромина брались в виде растворов, теобро-

мин же из-за плохой растворяемости его в буфере вносился в сосудик в виде навески.

В опытах с адреналином мы брали, как и в предыдущих работах, в 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 вносилось 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 сосудика. Перед опытом в аппарате Варбурга определялась активность фенолазы по количеству поглощенного кислорода, пользуясь в качестве окисляющегося субстрата пирокатехином.

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

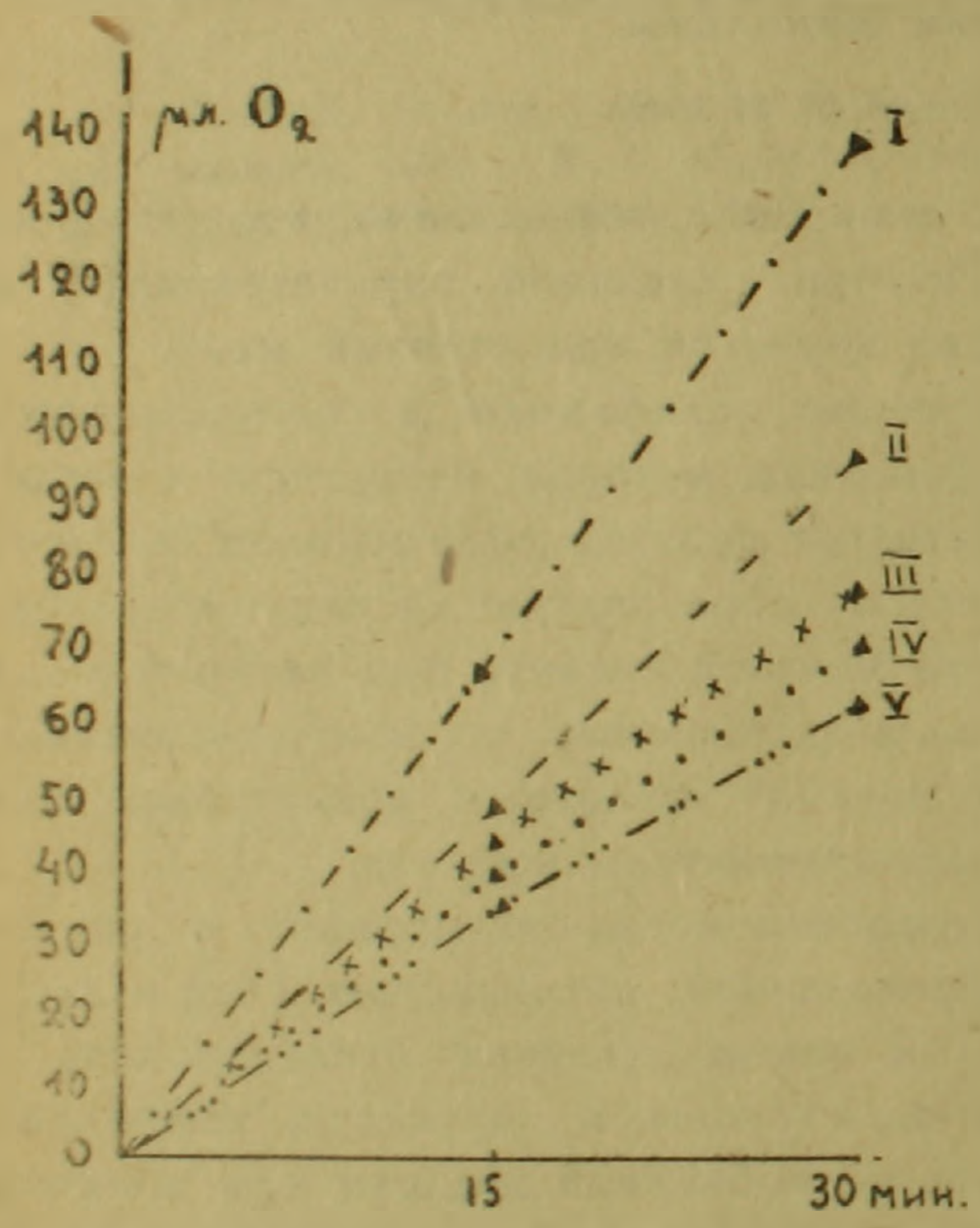

Рис. 1.

I — · — пирокатехин
II -- - - — пирокатехин + теофиллин
III × × × пирокатехин + теобромин
IV . . . пирокатехин + кофеин
V —· · · — пирокатехин + мочевая кислота

После регуляции давления в сосудиках, через каждые 15 минут производился отсчет поглощенного кислорода. Опыты с каждым веществом ставились оновременно в трех сосудиках, 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 μл 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 теобромином и теофиллином несколько сильнее тормозит окисление пирокатехина.

Результаты исследований, полученные 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.

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 безкислородной фазе, полученные о-хиноны, уплотняются в окрашенные таннины. 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 таннином. Обнаруженное нами поведение метил-оксипуринов при окислении пирокатехина фенолазой говорит о возможной 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 брали мы в наших опытах (0,23 — 0,27%), то эта возможность становится более вероятной.

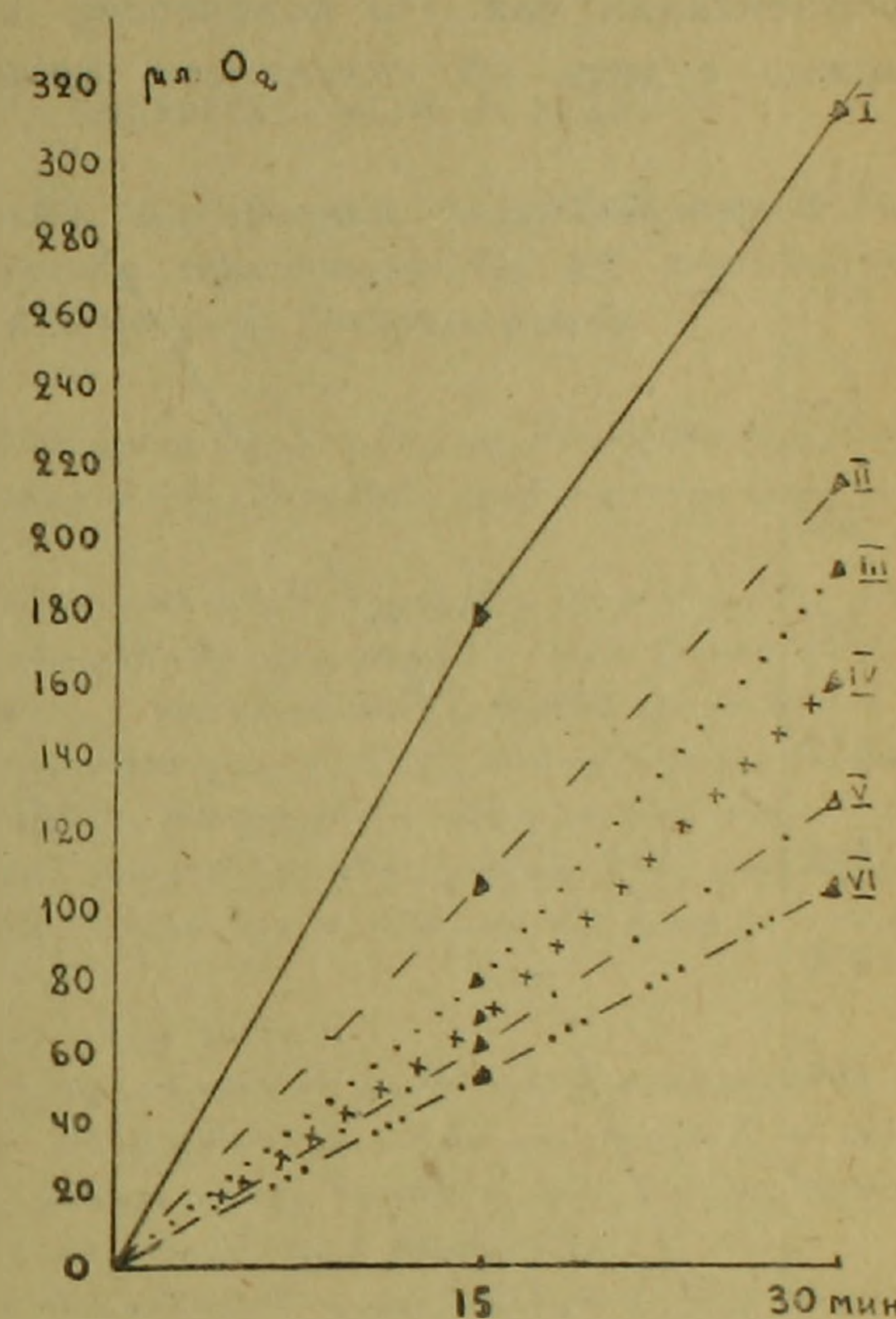

Рис. 2.

I —— пирокатехин + фенолаза
II — — — пирокатехин + фенолаза + теофиллин
III . . . пирокатехин + фенолаза + кофеин
IV × × × пирокатехин + фенолаза + теобромин
V — · — пирокатехин
IV — . . . — пирокатехин + фенолаза + мочевая кислота

С другой стороны известно, что аскорбиновая кислота, которой богат чайный лист, редуцирует образовавшиеся хиноны в полифенолы, задерживая образование таннинов. По исследованиям Робертса ([8]) добавление аскорбиновой кислоты задерживает образование таннинов и чайный лист сохраняет свою зеленую окраску, пока аскорбиновая кислота полностью не окислится, что и происходит в самом начале ферментации 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]), каковое свойство они проявляют и при наличии перекиси водорода ([11]). Все вышеизложенное побуждает нас изучить значение метил-оксипуринов в процессе ферментации чая, в особенности в начале окислительной фазы, еще до образования высокомолекулярных таннинов, с которыми связывается часть кофеина.

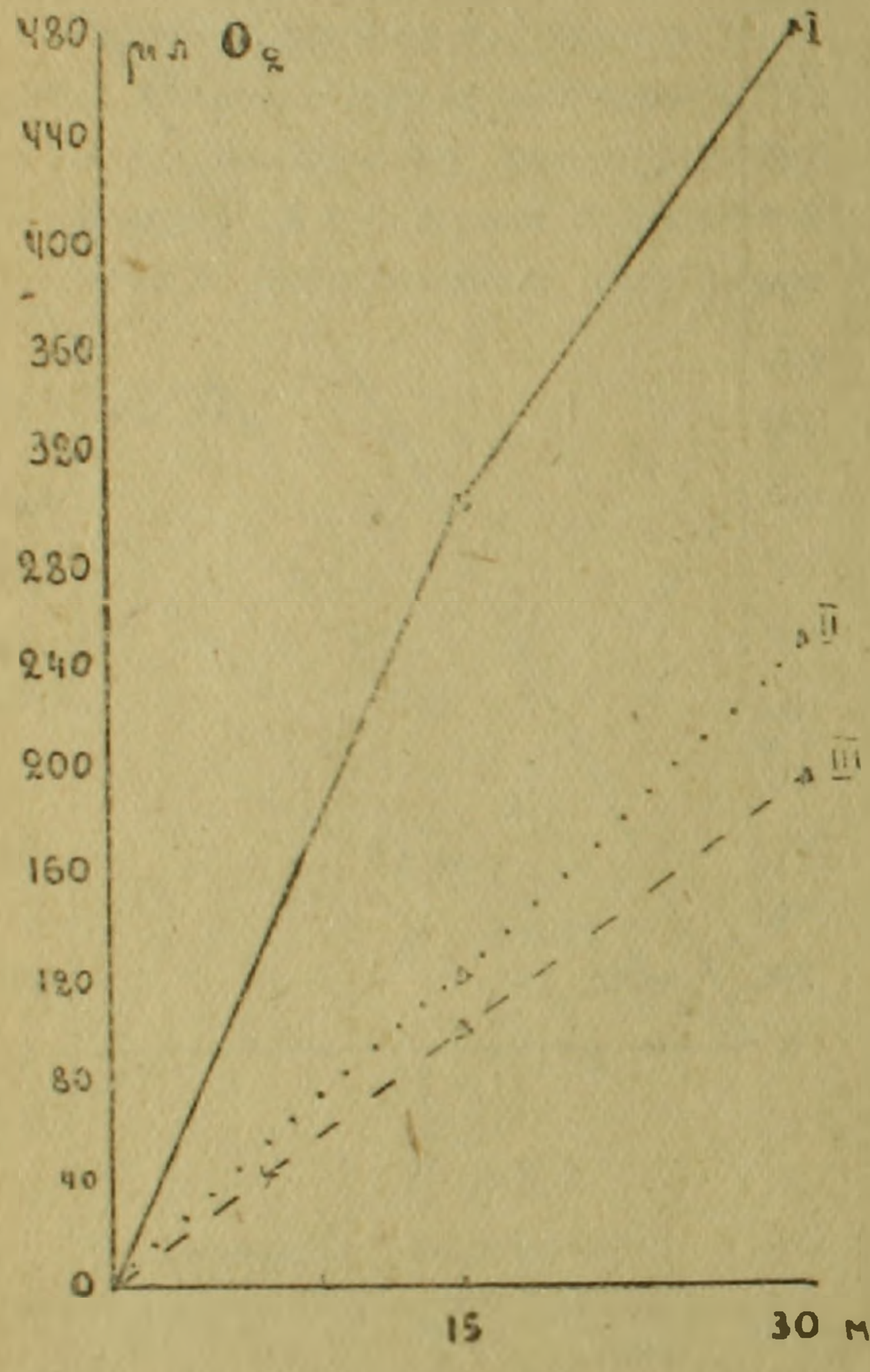

Рис. 3.

I ——— адреналин + фенолаза
II . . . адреналин + фенолаза + мочевая кислота
III — — — адреналин

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

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

Тормозящее действие оксипуринов при окислении пирокатехина и адреналина в присутствии меди мы объяснили связыванием последней с оксипуринами с понижением окислительного потенциала меди. Как объяснить подобное действие оксипуринов на фенолазу, этот вопрос является предметом дальнейших исследований.

Выводы: 1. Мочевая кислота задерживает окисление пирокатехина и адреналина в присутствии фенолазы.

2. Теобромин, кофеин, теофиллин оказывают тормозящее действие на окисление пирокатехина фенолазой в следующей последовательности: теобромин, кофеин, теофиллин.

Институт физиологии
Академии Наук Армянской ССР
Ереван, 1949, май.

Հ. Խ. ԲՈՒՆԻԱԹՅԱՆ, Վ. Գ. ՄԽԻԹԱՐՅԱՆ ԵՎ Վ. Բ. ԵՂՅԱՆ

Օքսիդուրիճների մասնակցությունը ադրենալինի փոխանակության մեջ. III. Օքսիդուրիճների ազդեցությունը պիրոկատեխինի եվ ադրենալինի օքսիդացման վրա ֆենոլազայի ներկայությամբ

Ինչպես հաղորդումներում ([1,2]) մենք ցույց էինք տվել, որ մլեկաթթուն պոնձի առկայությամբ արդելակում է պիրոկատեխինի ու ադրենալինի օքսիդացումը ֆոսֆատային բուֆերում և Ռինգերի լուծույթի մեջ։

Տվյալ աշխատության մեջ մենք մեր առաջ խնդիր դրեցինք պարզելու, թե ինչպես կազդի մլեկաթթուն ադրենալինի և պիրոկատեխինի օքսիդացման վրա ֆենոլազայի ներկայությամբ։ Ֆենոլազան, ինչպես գիտենք, հանդիսանում է պղինձ պարունակող ֆերմենտ և արագությամբ օքսիդացնում է պոլիֆենոլները։ Մեզ համար հետաքրքրական էր պարզել նաև մեթիլօքսիպուրիննների (կոֆեին, թեոֆիլին և թեոբրոմին) ազդեցությունը վերոհիշյալ նյութերի օքսիդացման վրա, քանի որ նրանք բավականին տարածված են ուժեղ արտահայտված պոլիֆենոլազային հատկություն ունեցող մի շարք բույսերի մեջ (թեյ և այլն)։

Այդ ուղղությամբ դրված փորձերը ցույց տվին՝

1. Մլեկաթթուն արգելակում է պիրոկատեխինի և ադրենալինի օքսիդացումը ֆենոլազայով, 2. թեոբրոմինը, կոֆեինը և թեոֆիլինը նույնպես արգելակում են պիրոկատեխինի և ադրենալինի օքսիդացումը ֆենոլազայով, որոնցից ավելի ուժեղ արգելակող ազդեցություն են ցուցաբերում թեոբրոմինը, կոֆեինը և թեոֆիլինը։

Ստացված տվյալները կարևոր են կենդանական օրգանիզմներում ադրենալինի փոխանակության մեջ օքսիդուրիննների և մեթիլ-օքսիպուրիննների դերը պարզաբանելու համար, իսկ բուսական օրգանիզմում նրանք նշանակություն են ստանում պոլիֆենոլների այն ձևափոխումների մեջ, որոնք կապված են նրանց օքսիդացման հետ։

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Г. Х. Бунятян* и *В. Г. Мхитарян*. Изв. АН Армянской ССР, № 4, 89, 1947. 2. *Г. Х. Бунятян* и *В. Г. Мхитарян*. Науч. тр. Ин-та физиол. АН Армянской ССР. **1**, 49, 1948. 3. *Г. Х. Бунятян* и *В. Г. Мхитарян*. Изв. АрмФАН СССР, № 4—5, 251, 1940. 4. *K. V. Giri* a. *P. V. Krichnamurthy*. Nature, 147, 59, 1941. 5. *В. А. Энгельгардт* и *В. Н. Букин*. Биохимия, **2**, 274, 1937. 6. *А. Л. Курсанов*. Биохимия, **6**, 312, 1941. 7. *H. B. Sreerangachar*. Bioch. J., **37**, 656, 661, 667, 1943. 8. *E. A. H. Roberts*. Bioch. J., **33**, 842, 1943. 9. *H. B. Sreerangachar*. Bioch. J., **37**, 653, 1943. 10. *Г. Х. Бунятян*. Тр. Всесоюз. Витаминной Конференции, 68, 1940, Биохимия, **6**, 155, 1941. 11. *Г. Х. Бунятян, В. Г. Мхитарян* и *В. Б. Егиян*. Науч. тр. Ин-та физиол. АН Армянской ССР, 59, 1948.