

И. Г. Асланян

К вопросу о почечной триптофанпирролазе

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятяном 16/V 1966)

Как известно, превращение триптофана в кинуренин с участием триптофанпирролазы происходит в печени животных. Печеночная триптофанпирролаза, впервые описанная Котаке в 1934 г. и очищенная Танака и Ноксом (¹), представляет собой железосодержащий фермент. Исследование его спектра выявило наличие порфириновой группировки.

Первые данные относительно адаптивных свойств печеночной триптофанпирролазы были получены Ноксом и Мелером, наблюдавшими после введения триптофана крысам и кроликам резкое повышение активности этого фермента (²).

Наши предыдущие исследования показали (³), что активность триптофанпирролазы, как адаптивного фермента, проявляется и в печени кур, лягушек и рыб вида „золотая рыбка“, однако слабее, чем в печени крыс.

По ходу наших исследований мы обнаружили наличие триптофанпирролазной активности в почечной ткани у белых крыс, чего не наблюдалось у кроликов, кур, черепах и лягушек. Невысокая активность триптофанпирролазы наблюдалась в почках морских свинок. В литературе мы не встретили указаний по существованию ферментативной системы, окисляющей триптофан в кинуренин в других органах животных, кроме печени. В связи с этим представляло несомненный интерес изучение активности указанного фермента в почках крыс, а также проведение сравнительной оценки его с печеночной триптофанпирролазой, что стало предметом наших исследований, результаты которых представлены в настоящем сообщении.

Опыты проводили на гомогенатах печени и почек белых крыс весом в 100—200 г. Активность триптофанпирролазы определяли методом Нокса (⁴). В качестве субстрата использовали *dL*-триптофан.

В первую очередь перед нами стояла задача показать, что факт, обнаруженный нами, является проявлением ферментативной активности в почечной ткани. С этой целью мы предприняли исследования

по температурной обработке гомогенатов почек белых крыс при 37°, 45°, 60° и 70°C.

Как показали результаты наших исследований, температурная обработка почечных гомогенатов крыс при 37°, 45°, 60°, 70°C приводит к закономерному понижению каталитической активности гомогената. Следует отметить, что 10-минутное нагревание гомогенатов при 70° приводит к полному исчезновению каталитической активности гомогената, что свидетельствует о ее ферментивной природе. Для сравнения одновременно мы произвели температурную обработку печени при 37°, 45°, 60° и 70°C. Выяснилось, что печеночная триптофанпирролаза менее термостабильна, чем почечная. Выдерживание гомогенатов печени при 60°C уже приводит к полному исчезновению деятельности фермента, тогда как в почках обработка при 60° сопровождается еще заметным сохранением активности триптофанпирролазы.

В дальнейшем, поскольку в наших исследованиях мы в качестве субстрата пользовались *dl*-триптофаном, представляло несомненный интерес выяснить, какая форма триптофана окисляется в кинуренин в почечной ткани. Выяснилось, что в почках подвергается окислению *d* форма триптофана. Таким образом, не представляло сомнений, что мы имеем дело с двумя различными ферментами, участвующими в процессе окисления триптофана в кинуренин в печеночной и почечной тканях.

Далее было необходимо изучить некоторые условия действия почечного фермента и прежде всего установить его оптимальный pH. Известно, что печеночная триптофанпирролаза проявляет свою максимальную активность при pH 7, а выявленный нами фермент почек — при pH 8. В то же время выяснилось, что активность фермента в почках значительно ниже, чем в печени.

В настоящее время известно более 100 ферментов, действие которых значительно страдает при связывании содержащихся в них сульфгидрильных групп. Исследованиями Кацура и Сейхи⁽⁵⁾ показано, что *p*-хлормеркурибензоат (*p*-ХМБ) в концентрации более 1 мМ, тормозит активность триптофанпирролазы, малые же дозы его (0,5 мМ), наоборот, оказывают противоположное действие. Авторы высказывают предположение, что в данном случае *p*-ХМБ, по всей видимости, тормозит активность самой триптофанпирролазы.

Нашими исследованиями показано, что при добавлении к гомогенатам печени и почек крыс *p*-ХМБ, моноiodоксусной кислоты и *N*-этилимида малеиновой кислоты (10^{-2} М) активность триптофанпирролазы подавляется (табл. 1). Этот факт свидетельствует о том, что последняя в печени и почках крыс является тиоловым ферментом. Интересно отметить, что в тех же условиях цистеин, цистин и глутатион (восстановленный) (10^{-3}) также понижают активность фермента в печени, в то время как в почках цистеин и глутатион оказывают стимулирующее действие.

Таблица 1
Активность триптофанпирролазы у крыс (в мкМ кинуренина на 1 г свежей ткани)

П е ч е н ь

Контроль	п-ХМБ	Контроль	Моноидуксусная кислота	Контроль	N-этилимид маленн. к-ты
3,13±0,33	1,25±0,48 p<0,001	2,89±0,44	2,18±0,42 p<0,1 P>0,005	3,24±0,21	0,63±0,21 p<0,001

П о ч к и

0,97±0,14	0	0,75±0,05	0,44±0,06 p<0,001	0,94±0,2	0,51±0,1 p>0,001 P<0,005
-----------	---	-----------	----------------------	----------	--------------------------------

П е ч е н ь

Контроль	Цистеин	Контроль	Глутатион	Контроль	Цистин
3,42±0,24	1,29±0,36 p<0,001	3,40±1,6	2,30±1,40 p<0,2 P>0,1	4,58±1,5	0,99±0,28 p>0,001

П о ч к и

0,93±0,06	1,55±0,4 p>0,005 P<0,01	0,72±0,12	1,24±0,4 p>0,01 P<0,025		
-----------	-------------------------------	-----------	-------------------------------	--	--

П е ч е н ь

П о ч к и

Контроль	KCN	Контроль	KCN
3,08±0,9	0,53±0,16 p<0,001	0,82	0,85

Торможение активности ферментов под действием цистеина может происходить различными путями (6). Известно, что он оказывает тормозящее действие на многие пептидазы, которые активируются ионами металлов. Рядом авторов (7) показано, что цистеин с металлами образует комплексы. Поскольку печеночная триптофанпирролаза, как широко представлено в литературе, является металлоэнзимом, можно предположить, что цистеин образует с железом комплексное соединение и тем самым ингибирует активность фермента. Эта точка зрения подкрепляется и тем, что, как известно, димеркаптопропанол тоже связывает металлы и в наших опытах ингибирует только триптофанпирролазу печени, не влияя совершенно на почечный фермент.

Окисление активных тиоловых групп ферментов приводит к торможению их активности. Среди многочисленных реагентов, пере-

водящих тиоловые группы ферментов в дисульфидные, наиболее специфическими являются цистин и окисленный глутатион. Возможно, что торможение триптофанпирролазы в печени под действием цистина происходит вследствие окисления активных тиоловых групп этого фермента.

Таким образом, тот факт, что в почках цистеин и глутатион активируют триптофанпирролазу, а в печени оказывают обратное действие, наводит на мысль, что в почках фермент, окисляющий *d* триптофан в кинуренин, не содержит металла.

Еще одним доказательством того, что почечный фермент не содержит железа в своем составе и не является железопорфирином, в противоположность печеночному, является тот факт, что активность триптофанпирролазы под действием KCN (10^{-3} M) в гомогенатах печени крыс сильно тормозится, между тем как на почечный фермент он не влияет (табл. 1).

В наших последующих экспериментах, выяснилось, что при добавлении к гомогенатам почек прокипяченного гомогената печени активность почечной триптофанпирролазы совершенно не изменяется. Это тоже говорит в пользу отсутствия железопорфирина в почечной триптофанпирролазе; в противном случае кофактор, оставшийся в гомогенате печени крыс после его кипячения, должен был бы активировать почечный фермент.

Явление адаптации триптофанпирролазы при голодании показано исследованиями некоторых авторов. Пинто и др. (8) показано, что активность триптофанпирролазы в гомогенатах печени крыс (самцов) после 8-дневного голодания повышается.

В наших экспериментах обнаружилось, что во время кратковременного голодания (20 час.) активность триптофанпирролазы печени крыс повышается более чем в 2 раза, а при более длительном голодании в три и более раза. Интересно отметить, что триптофанпирролаза почек крыс не является адаптивным ферментом; голодная диета, а также введение триптофана и кортизона не оказывают заметного влияния на ее активность.

Как предполагает Танака (9), активация триптофанпирролазы печени связана с восстановлением Fe^{3+} , связанного с триптофанпирролазой, в Fe^{2+} под действием триптофана и H_2O_2 . В то же время, как показано другими авторами, введение триптофана стимулирует образование связи между апоферментом и коферментом, а также стабилизирует эту связь. Но если это так, тогда становится понятным, почему в почках крыс фермент, участвующий в окислении триптофана в кинуренин, не индуцируется субстратом; вероятно, это обусловлено отсутствием в нем железопорфирина.

Известно, что триптофанпирролаза печени животных сосредоточена в надосадочной жидкости, однако ее активность проявляется полностью лишь после добавления микросом к надосадочной жидкости. В последних находится кофактор триптофанпирролазы печени—

железопорфирина. Нашими исследованиями установлено, что в почках этот фермент проявляет наибольшую активность в ядерной фракции. Во фракции гналоплазма+микросомы нами не обнаружена заметная активность триптофанпирролазы. Таким образом, печеночная и почечная триптофанпирролазы распределены в разных структурных элементах клетки.

Полученные факты дают нам основание предполагать, что почечный и печеночный ферменты являются ферментами, отличающимися друг от друга по своей природе.

Институт биохимии Академии наук
Армянской ССР

Ի. Հ. ԱՍԼԱՆՅԱՆ

Երիկամային տրիպտոֆանպիրոլոզայի հարցի շուրջը

Մեր կողմից առաջին անգամ սպիտակ առնետների և ծովախոզուկների երիկամներում հայտնաբերվել է ֆերմենտ, որը օքսիդացնում է տրիպտոֆանը և փոխարկում կինուրենինի նրջված ֆերմենտը չի հայտնաբերվել ճաղարների, հավերի, կրիաների և գորտերի երիկամներում: Հիմք կա մտածելու, որ ի տարբերություն լյարդի ֆերմենտի, երիկամի ֆերմենտը երկաթ-տորֆիրինային բնույթ չունի և կենտրոնացված է կորիզային ֆրակցիայում:

Լյարդի և երիկամային տրիպտոֆանպիրոլոզաները յիուային ֆերմենտներ են: Երիկամային տրիպտոֆանպիրոլոզան աշայտիվ ֆերմենտ չի հանդիսանում:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Վ Ա Ն Ո Ւ Մ Յ Ո Ւ Ն

¹ T. Tanaka и В. Е. Нокс, J. Biol. Chem. 234, 1162, 1959. ² В. Е. Нокс, Science 113, 237, 1951. ³ И. Г. Асланян, Биологический журнал Армении, том XIX, 2, 60, 1966. ⁴ W. E. Knox, Methods in enzymology v. 2, 243, 1955. ⁵ Катсуро, Окуи Сейхи, Blochim. at biophys acta 81—313, 602—604, 1964. ⁶ В. С. Оганесян, Диссертация, 1963. ⁷ Williams, The enzymes v. 1, 391, 1959. ⁸ П. В. Пуинто, Г. Л. Розенталь, Experientia 21, № 9, 1965. ⁹ T. Tanaka, Tryptophan metabolism, v. 1, 1964, 53—54, Discuss 67—74.