

И. Д. ИВАНОВ

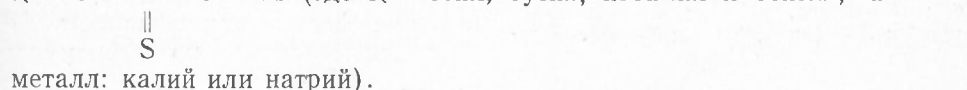
ТОРМОЖЕНИЕ МОНО- И ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КСАНТОГЕНАТАМИ

(Представлено академиком А. И. Опарным 22 II 1954)

Окислительные превращения моно- и полифенолов (фенола, пирокатехина, тирозина, диоксифенилаланина и др.) лежат в основе меланино-, адреналино- и тироксинаобразования в организме. Участие медьсодержащих ферментов в двух последних процессах недостаточно изучено. Представляет интерес изучение роли медьсодержащих ферментов при различных паталогических состояниях: пигментных раковых опухолях (меланомы) ⁽¹⁾, гипертиреозидизме ⁽²⁾ и др.

В качестве ингибиторов медьсодержащих ферментов обычно применяются соединения, содержащие группу $=C=S$: тиомочевина, фенил-тиомочевина, диэтилдитиокарбамат, а также вещества иной структуры — глутатион, цистеин, 2,3-дителиопропанол, салицилоксим ⁽³⁾ и каротин ⁽⁴⁾. Тиомочевина и тиоурацил применяются при лечении больных базедовой болезнью ⁽²⁾.

Целью настоящей работы является привести доказательства в пользу ингибирующего действия ксантогенатов — соединений с общей формулой:



Ингибирующее действие этилксантогената калия испытывалось при различных значениях pH. Остальные ксантогенаты изучались для того, чтобы проследить ингибирующий эффект некоторых высших гомологов этого ряда соединений. Опыты проводились хронометрически.

Бутил-, изоамил- и бензилксантогенаты синтезированы нами по общему методу синтеза этилксантогената калия ⁽⁵⁾. Последний применялся как готовый препарат фирмы «Мерк». Полученные нами препараты были однократно перекристаллизованы бензолом из ацетонового раствора.

Ферментный препарат получался из поверхностного слоя картофельного клубня, который снимался деревянным ножом. 20 г нарезанного картофеля растирались в ступке и к ним добавлялось 20 мл воды. Через 30 мин. экстракт фильтровался через марлю и центрифугировался. К 1 мл центрифугата добавлялось по 3 мл ацетона и образовавшийся осадок растворялся в 20 мл воды. В таком виде ферментный раствор (основной раствор) разбавлялся непосредственно перед употреблением, в зависимости от каталитической активности препарата. Для этого мы подбирали такое разведение ферментного раствора, при котором появление о-хинонов после добавления аскорбиновой кислоты обнаруживалось на 35—37 минуте для монофенолоксидазной и на 5 минуте для полифенолоксидазной активности. Обыкновенно разведение основного раствора дистиллированной водой было в пределах до 1:1,5 и реже 1:3.

Все реактивы готовились на фосфатно-цитратной буферной смеси при рН 6,4; 6,8 и 7,2. Первоначальная концентрация ксантогенатов была $1 \cdot 10^{-2}$ М, пирокатехина $0,5 \cdot 10^{-3}$ М, фенола $1 \cdot 10^{-2}$ М и витамина С $0,6 \cdot 10^{-3}$ М.

Для лучшей аэрации использовался качающий механизм и колбы емкостью 200 мл.

Состав проб: 0,5 мл соответствующего раствора ксантогената, 3,5 мл фосфатно-цитратной буферной смеси с вышеуказанным рН и 1,0 мл раствора ферментного препарата. Ингибитор в активной пробе заменялся

соответствующим объемом буфера. Параллельно составлялась контрольная проба с добавлением фермента, инактивированного нагреванием. Конечная концентрация ксантогенатов в реактивной смеси равнялась $1 \cdot 10^{-3}$ М.

После инкубации фермента с ингибитором при 37° в течение 30 мин., остаточная ферментная активность испытывалась при добавлении 5 мл аскорбиновой кислоты и 5 мл раствора пирокатехина или фенола. Сразу после добавления субстрата, по 1 мл реактивной смеси переносилось в пробирки, содержащие по 1 мл 1 N HCl и 0,1 мл 0,25% раствора крахмала. Такие же пробы брались через определенные промежутки времени (см. рис. 1 и 2).

Результаты определялись числом миллилитров 0,002 N раствора иода, пошедшего на титрование аскорбиновой кислоты. Остаточная ферментная активность (X) рассчитывалась по формуле:

$$X = \frac{100 \cdot K - I}{K - A}, \text{ где } K — \text{инак-}$$

тивированный нагреванием контроль, I — проба, содержащая ингибитор и A — активная проба. Ингибирующий эффект находится по разности $100 - X$.

В первой серии опытов была поставлена задача выяснить, во-первых, величину ингибирующего эффекта этилксантогената при концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М и, во-вторых, проследить влияние концентрации водородных ионов на ингибирующий эффект этого вещества.

Данные, полученные из 5 опытов для моно- и из 6 опытов — для полифенолоксидазной активности, графически представлены на рис. 1 и 2.

Из графиков рис. 1 и 2 видно, что на 35-й минуте для моно- и на 5-й минуте для полифенолоксидазной реакции ингибирующий эффект этилксантогената изменяется в зависимости от рН среды. Так, например, ингибирующий эффект для монофенолоксидазной активности при рН 6,4 равняется 66,7%, при рН 6,8 — 66,7% и при рН 7,2 — 48%. При тех же значениях рН для полифенолоксидазной активности ингибирующий эффект доходит соответственно до 81,6; 71,4 и 43,6%. Задержка полифенолоксидазной реакции этилксантогенатом при рН 7,2 падает чувствительнее, чем при монофенолоксидазной реакции (около 50%). То, что подщелачивание среды влияет лишь на ингибирующую способность этилксантогената, видно еще из того, что полифенолоксидазная активность

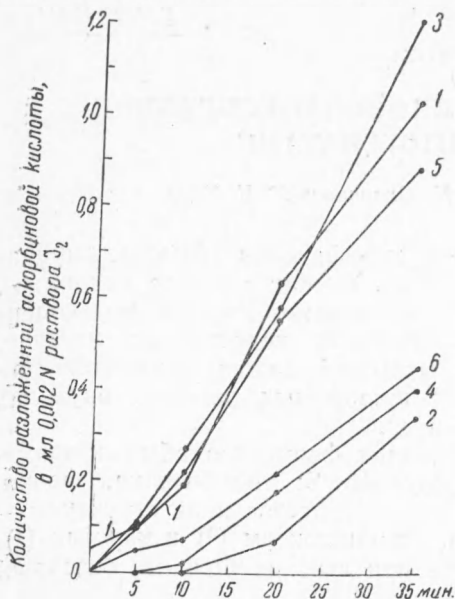


Рис. 1. Торможение монофенолоксидазной активности этилксантогенатом ($1 \cdot 10^{-3}$ М). 1 — фенол, рН 6,4; 2 — фенол + экг, рН 6,4; 3 — фенол, рН 6,8; 4 — фенол + экг, рН 6,8; 5 — фенол, рН 7,2; 6 — фенол + экг, рН 7,2

при pH 7,2 остается такой же, как и при pH 6,4 и 6,8 (см. кривые 1, 3 и 5 на рис. 2). При монофенолоксидазной реакции, однако, подщелачивание среды влияет и на ферментную активность. Это объясняется тем, что монофенолоксидазное действие проявляется оптимально при pH 6,8 (см. кривую 3 на рис. 1), в то время как оптимальное pH для полифе-

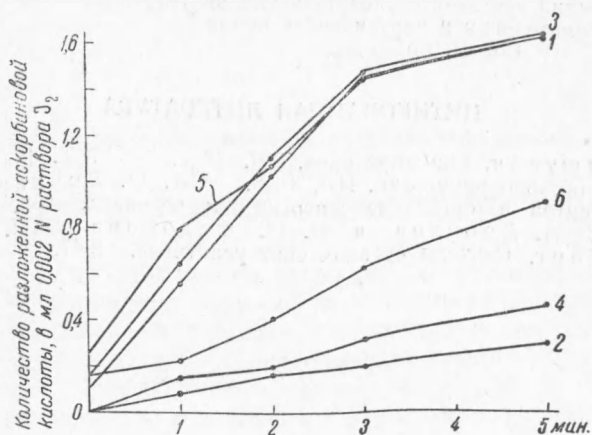


Рис. 2. Торможение полифенолоксидазной активности этилксантогенатом ($1 \cdot 10^{-3}M$). 1 — пирокатехин, pH 6,4; 2 — пирокатехин + экг, pH 6,4; 3 — пирокатехин, pH 6,8; 4 — пирокатехин + экг, pH 6,8; 5 — пирокатехин, pH 7,2; 6 — пирокатехин + экг, pH 7,2

нолазной активности переходит в слабощелочную сторону и диапазон оптимальных значений pH шире, чем при монофенолоксидазной реакции.

Целью следующих опытов являлось показать ингибирующий эффект некоторых высших homologов ксантогенатов при pH 7,2. Мы остановились на алифатических ксантогенатах: бутил- и изоамилксантогенатах и из ароматических на бензилксантогенате.

Суммарные результаты из 3 опытов для моно- и из 3 опытов для полифенолоксидазной активности представлены графически на рис. 3.

К концу полифенолоксидазной реакции ингибирующий эффект бутилксантогената равняется 86,8%, для изоамилксантогената 86,2% и для бензилксантогената 79,2%. При монофенолоксидазной реакции тот же эффект равняется для бутилксантогената 95,3%, для изоамилксантогената 91,6% и для бензилксантогената 100%.

Если сравнить данные рис. 3 с теми, которые приведены на рис. 1 и 2 для опытов, проведенных при pH 7,2, можно заметить, что ингибирующий эффект этилксантогената на 50% ниже, чем эффект торможения бутил-, изоамил- и бензилксантогенатов.

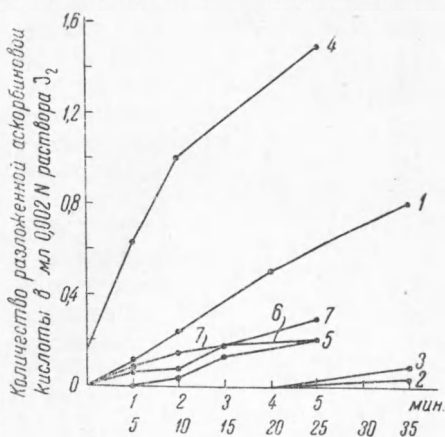


Рис. 3. Торможение моно- и полифенолоксидазной активности ксантогенатами ($1 \cdot 10^{-3}M$), pH 7,2. 1 — фенол; 2 — фенол + бутилксантогенат; 3 — фенол + изоамилксантогенат; 4 — пирокатехин; 5 — пирокатехин + бутилксантогенат; 6 — пирокатехин + изоамилксантогенат; 7 — пирокатехин + бензилксантогенат

Вообще, на основании полученных данных можно считать доказанным, что ксантогенаты являются сильными ингибиторами для активности медьсодержащих ферментов.

Вопрос о специфичности ксантогенатов как ингибиторов медьсодержащих ферментов остается открытым.

Республиканский научно-исследовательский институт
по гематологии и переливанию крови
София, Болгария

Поступило
18 II 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Дж. Гринштейн, Биохимия рака, ИЛ, 1951. ² А. Т. Камерон, Достижения современной эндокринологии, ИЛ, 1948. ³ А. О. Войнар, Биологическая роль микроэлементов в организме животных и человека, 1953. ⁴ С. Д. Балашовский, Н. Н. Дроздов и В. Н. Федорова, ДАН, **87**, 453 (1952). ⁵ Л. М. Кульберг, Синтезы органических реактивов, 1947.