

## Kolin kao efektor, odnosno kolin- $\beta$ -glicerofosfat kao supstrat fosfataza\*

A. Režek i N. Škarica

Zavod za kemiju, Veterinarski fakultet, Zagreb

Primljeno 4. novembra 1952.

Istraženo je djelovanje različnih fosfataza na kolin- $\beta$ -glicerofosfat kao supstrat, a time ujedno i efektorsko djelovanje kolina na djelatnost fosfataza. Ustanovljeno je, da kolin djeluje na neke fosfataze aktivirajući, na neke pak inhibirajući, a da ima i takvih fosfataza, koje u kiselijem području inhibira, a u lužnatijem aktivira.

Od brojnih efektora različnih fosfataza biogeni amin kolin ostao je sve donedavno, kanda, posve zanemaren, premda mu se u suvremenoj fiziologiji pripisuje nekoliko znatnih, važnih funkcija, od kojih je znatnija čest povezana upravo s funkcijama fosforne kiseline pa prema tome i s djelovanjem fosfataza. Uzme li se u obzir, da se kolin — za izvršivanje možda sviju svojih posrednih i neposrednih funkcija — pokreće vjerojatno baš iz svojih fosforinih estera (fosforilkolina, glicerilfosforilkolina, lecitinskih tvari i sl.), a po izvršenoj funkciji vjerojatno i pohranjuje u tim tvarima\*\*, to ne će biti teško razumjeti, zbog čega je zanimljivo, da se upozna i utjecaj kolina na tijek fermentnih reakcija, u kojima i sâm nastaje. Štoviše, u efektorskom djelovanju kolina na fermentnu hidrolizu njegovih fosforinih estera leži možda i jedna od poluga mehanizma, kojemu je podvržen sklop kemijskih reakcija, osobito reakcija pri neurohumoralnom prijenosu podražaja i u prijetvoru masti.

Efektorski učinak brojnijih lančastih aminoalkohola (i njihovih na dušiku supstituiranih derivata, uključivši kolin i acetilkolin) na djelatnost alkalične fosfataze bubrega, kore i srži nadbubrega i jetre goveda opisali su nedavno u nizu rasprava R. Granger i suradnici<sup>1</sup>. Jedan dio svojih istraživanja, izvršenih u pokusima in vivo, upravili su čak i na pitanje efekorskog djelovanja kolina primijenjenog u terapeutske svrhe. Što se tiče kolina ustanovili su, povrh ostalog, da između svih od njih istraženih tvari kolin najjače aktivira djelovanje spomenutih alkaličnih fosfataza.

Spomenuta dva estera kolina i fosforne kiseline, t. j. fosforilkolin i glicerilfosforilkolin (obadva sastavine lecitinskih tvari), sigurno su uglavljeni i kao zasebne fiziološke tvorbe pa prema tome i kao prirodni supstrati fosfataza<sup>2, 3</sup>. Glicerilfosforilkolin je, povrh toga što je metabolit, i jedan od izuzetno rijetkih prirodnih diestera fosforne kiseline. Fosforilkolin ima pak naročito značenje kao redovna sastavina ejakulata, pa prema tome i kao prirodni supstrat kiselih fosfataza<sup>4</sup> odnosno ejakulata<sup>5</sup>, a nedavno našao se u središtu pozornosti istraživača fosfataza, jer su mu

\* Priopćeno na Sastanku kemičara FNRJ i I. kongresu za čistu i primijenjenu kemiju NR Hrvatske, Zagreb, u oktobru 1952.

\*\* Zamašna pitanja o pohrani, razgradnji i izlučivanju kolina te o tvarima kolin-donatorskih, odnosno kolin-akceptorskih funkcija jamačno će se dati riješiti primjenom radioaktivnih atoma.

W. Kutscher i H. Sieg<sup>6</sup> pripisali svojstva tobožnjeg kofermenta bubrežne fosfataze čovjeka.

Naša istraživanja, kojih rezultate prikazujemo u ovoj kratkoj raspravi, ponešto su posebne naravi, i to zbog toga, što smo kolin u svim dosada izvršenim pokusima unosili u pokusne ogledne neposredno sa samim supstratom. Došli smo naime u priliku, da umjesto glicerofosfata, kao najprikladnijeg prirodnog supstrata za određivanje djelatnosti fosfataza, otopini kojih bi trebalo kolin dodavati zasebice, upotrebimo kolinovu sol  $\beta$ -glicerofosforne kiseline, t. j. kolin- $\beta$ -glicerofosfat ( $C_8H_{22}O_7NP$ ). Ta tvar nastaje i u sintezi H. Arnolda,<sup>7</sup> i to namjesto očekivanog diestera fosforne kiseline, t. j.  $\beta$ -glicerilfosforilkolina, kako su to nedavno uspjeli dokazati, primjenom uobičajenih postupaka, M. Aloisi i P. Buffa<sup>8</sup> i jedan od nas<sup>9</sup> na taj način, što je kolin iz otopine tvori uklonio adsorpcijom, a preostali glicerofosfat upotrebio kao supstrat fosfataza. Neuspjela sinteza Arnolda kao i neke druge slične sinteze za dobivanje glicerilfosforilkolina<sup>8</sup> nadoknađene su međutim novim sintezama<sup>10</sup>. Isto je tako priređen nedavno i fosforilkolin<sup>11</sup> dobiven i u biosintezi *in vitro*<sup>12</sup>.

Kolin- $\beta$ -glicerofosfat svakako je neobičan supstrat. Na prvi pogled moglo bi se zaključiti, da nastaje samo kao umjetna tvorba. No sudeći po onome, što je već god. 1926. zabilježio o toj tvari P. Karrer<sup>13</sup>, t. j. da ju je našao u matičnicama dobivenim nefermentativnom hidrolizom lecitinskih tvari, moralo bi se u najmanju ruku pretpostaviti, da je i kolin-glicerofosfat također prirodna, fiziološka tvorevina. Tu bi pretpostavku na svoj način potkrepljivali i rezultati istraživanja E. Baera i M. Katesa<sup>14</sup>, po kojima — suprotno opažanju Karrera<sup>13</sup> — među prirodnim lecitinskim tvarima ne bi trebali prevladavati  $\beta$ -oblici (po Karreru oko 80%), ali ni  $\alpha$ -oblici, i to poradi toga, što postoji sposobnost izomerizacije, koja može biti izazvana već samom promjenom aktuelne kemijske reakcije. S druge strane potkrepljivali bi tu pretpostavku isto tako i rezultati spomenutog rada Aloisija i Buffe<sup>8</sup>, po kojima se kolin- $\beta$ -glicerofosfat daje prirediti zapravo na sasvim jednostavan način (za razliku od postupka Arnolda i drugih), i to u reakciji vodenih otopina ekvivalentnih količina  $\beta$ -glicerofosforne kiseline i kolinske baze.

Da bi dakle upoznali ponašanje kolin-glicerofosfata kao supstrata odnosno u isto doba i efektorski učinak kolina, koji se disocijacijom odvajaju sa samog supstrata, istražili smo — upotrebivši kao supstrat za isporodbu natrijev glicerofosfat, »Merck«, smjesa  $\alpha + \beta$  — djelovanje ovih fosfataza: kvašćevih gljivica, plijesni *Aspergillus niger*, sjemenaka ricinusa, krumpira, seruma konja, prostate psa, ejakulata bika, mokraćne čovjeka (muškarca), jetre goveda, bubrega svinje, uterusa krave, placente krave, kostiju kunića, mlijeka krave i otrova zmije poskok (*Vipera ammodytes*).

#### OPIS POKUSA

Kolin- $\beta$ -glicerofosfat dobili smo u spomenutoj sintezi Arnolda. Upotrebljena je vodena otopina čuvana uz dodatak toluola u hladioniku (1 ml otopine = 22,8 mg kolin- $\beta$ -glicerofosfata = 6,3 mg  $P_2O_5$  = 10 mg kolina). U jednakim koncentracijama otapan je i natrijev glicerofosfat. Količine kolina, unesene sa supstratom u pojedine pokusne ogledne, kretale su se između 5 i 10 mg (u cijelom ogledu između  $5,8 \times 10^{-3}$  do  $1,4 \times 10^{-2}$  M).

Otopine fosfataza — koliko nije neposredno upotrebljen nativni materijal — pripremali smo na uobičajen način, t. j. iscrpljivanjem fermentnog materijala, homogeniziranog u tarioniku s pomoću staklene prašine.

Za puferiranje pokusnih ogleda upotrebili smo: natrijev citrat-solnu kiselinu, odnosno natrijevu lužinu i veronal-solnu kiselinu.

Pojedini pokusni ogledi sastavljani su tako, da je ukupni volumen iznosio 6 do 9 ml.

Reakciona temperatura bila je 38°C.

Reakciono vrijeme kretalo se između 6 i 45 sati, već prema stupnju djelatnosti pojedinog fermentnog materijala.

Fosfor određivan je po metodi E. Müllera<sup>15</sup>, fotometrički; kao reduktivno sredstvo upotrebljen je »Amidol«.

#### PREGLED I OCJENA REZULTATA

*Kvaščeve gljivice.* Kolin ( $1,4 \times 10^{-2}$  M) koči djelatnost fosfataze kvašćevih gljivica u ekstremno i u ekstremnije kiselom reakcionom području, t. j. između pH = 1 i 3,9, ili, što je u našem slučaju isto, fosfataza kvašćevih gljivica ne razgrađuje u tom području kolin- $\beta$ -glicerofosfat u jednakoj mjeri, kao što razgrađuje natrijev glicerofosfat (rečeno vrijedi i općenito, t. j. kadgod se u raspravi govori o učinku kolina, treba taj učinak ocijeniti i s obzirom na razgradnju predloženog supstrata, t. j. kolin-glicerofosfata). Kod pH = 1 i 1,9 inhibicija je čak potpuna (kod pH = 3,3 iznosi oko 20%, a kod pH = 3,9 oko 10% razgrađenog supstrata manje). Naprotiv, nazočnost kolina jače aktivira fosfatazu kvašćevih gljivica djelatnu oko pH = 5 (oko 20% razgrađenog supstrata više) i nešto manje slabije djelatnu oko pH = 7 (oko 13% razgrađenog supstrata više).

*Aspergillus niger.* Fosfataza spomenute plijesni hidrolizira intenzivno natrijev glicerofosfat u reakcionom području između pH = 3,6 i 5,2. Kolin ( $5,8 \times 10^{-3}$  M) aktivira, i to u znatnijoj mjeri (oko 20% razgrađenog supstrata više) samo njezinu inače sasvim slabu djelatnost oko pH = 7, dakle slično kao što aktivira takvu djelatnost u kvašćevih gljivica.

*Sjemenke ricinusa.* Iz vodenih otopina sjemenaka ricinusa očituje se, u širokom reakcionom području između pH = 1,9 do gotovo 8, glicerofosfataza, kojoj je djelatnost osobito izrazita između pH = 2 i 6, a optimalna kod pH = 4,6. Kolin ( $9,2 \times 10^{-3}$  M) zaustavlja djelatnost spomenute fosfataze u području između pH = 4,6 i 6 (oko 25% razgrađenog supstrata manje). Naprotiv, u području oko pH = 8, t. j. u području lužnate fosfatatičke djelatnosti, kolin djeluje znatno aktivirajući (oko 35% razgrađenog supstrata više).

*Fosfataza krumpira.* Kolin ( $2,1 \times 10^{-3}$  M) aktivira samo onu fosfatazu krumpira, kojoj se djelovanje očituje u neutralnom reakcionom području (oko 23% razgrađenog supstrata više). Po tome, što aktivira neutralnu fosfatazu, efektorski je učinak kolina sličan učinku na fosfatazu kvašćevih gljivica i fosfatazu plijesni *Aspergillus niger*.

*Fosfataza seruma.* Efektorski učinak kolina ( $1,4 \times 10^{-2}$  M) na inače veoma slabu fosfatatičku djelatnost seruma (u reakcionom području između pH = 4 i 8) nije primjetljiv ni u oduljem reakcionom vremenu.

*Fosfataza prostate.* Prostata sadržava, kako je poznato, izvanredno kiselu fosfatazu, koja razgrađuje natrijev glicerofosfat u širokom kiselom reakcionom području, t. j. od pH = 2 pa dalje nekako do 6. No i djelatnost u lužnatom području još je dosta izrazita. Efektorski učinak kolina ( $1,4 \times 10^{-2}$  M) na dje-

latnost fosfataze prostate naročito je zanimljiv, osobito ako se isporedi s učinkom na djelatnost fosfataze ejakulata, odnosno mokraće. Kolin naime koči fosfatazu prostate u znatnijoj mjeri, ali samo u ekstremnije kiselom reakcionom području (oko 30% razgrađenog supstrata manje), dok joj djelatnost u lužnatom području (oko pH = 8,6) kanda pomalo aktivira.

*Fosfataza ejakulata.* Prema rezultatima naših pokusa ejakulat bika sadržava glicerofosfatazu, od koje se znatna i optimalna djelatnost očituje u širem pojasu kiselog reakcionog područja, t. j. između pH = 3,7 i 6,8, a neznatna, ali ipak zamjetljiva djelatnost i u lužnatom području između pH = 8 i 9. Efektorski učinak kolina ( $7,8 \times 10^{-3}$  M) na djelatnost spomenute fosfataze — pod našim pokusnim uvjetima — jedva da postoji. Neznatna aktivacija (oko 8% razgrađenog supstrata više) dala se uočiti samo oko pH = 6 i 8. Opisana neosjetljivost fosfataze ejakulata prema kolinu, i to neosjetljivost upravo prema njegovu inhibirajućem djelovanju, ima zacijelo i svoje naročito fiziološko značenje. Teško bi se naime dala razumjeti fiziološka funkcija danas već dobro poznate kisele fosfataze ejakulata (točnije fosforilkolinaze), kad bi kolin kočio njezinu djelatnost, jer se upravo toj fosfatazi pripisuje intenzivna razgradnja (neposredno nakon ejakulacije) spomenutog fosforilkolina, također redovne sastavine ejakulata, pri čemu se oslobađaju za efektorski učinak svakako dovoljne količine kolina. Ako se uzme u obzir poznato opažanje, da fosfat-ioni aktiviraju djelovanje hijaluronidaze ejakulata<sup>16</sup>, to bi tu fiziološku funkciju prema kolinu neosjetljive kisele fosfataze ejakulata, odnosno čitav taj reakcioni ustroj valjalo zamisliti ovako: Kisele fosfataze ejakulata, hidrolizirajući svoj prirodni supstrat fosforilkolin, povećava na taj način s jedne strane djelatnost hijaluronidaze ejakulata, a s druge pak strane priskrbljuje slobodni kolin, za koji bi se moglo pretpostaviti, da, povrh ostalog, djeluje na spermije kemotaksički.

*Fosfataza mokraće.* Kako je poznato, iz mokraće muškarca izlučuje se, i to periodički, naročita fosfataza (pretpostavlja se, da je podrijetlom iz prostate), kojoj je znatna djelatnost razvučena od ekstremno kiselog reakcionog područja pa sve do neutralnog. U lužnatom području, oko pH = 8,8, djelatnost joj je neznatna. Da se iz mokraće doista očituje spomenuta fosfataza (mjerili smo joj djelatnost između pH = 1,9 do 8,8), potvrđuju i rezultati naših pokusa. Efektorski učinak kolina ( $1,4 \times 10^{-2}$  M) na kiselu granu spomenute fosfataze mokraće nije se — pod našim pokusnim uvjetima — očitovao dovoljno jasno, premda je, s obzirom na njezino podrijetlo, valjalo očekivati u najmanju ruku sličan učinak kao i kod fosfataze prostate, t. j. inhibiciju u ekstremno kiselom području. Naprotiv, u neutralnom reakcionom području djelovanje kolina je izrazito aktivirajuće (oko 25% razgrađenog supstrata više).

*Fosfataza jetre.* Na četiri poznate izrazite djelatnosti fosfataze jetre, i to prve u kiselom reakcionom području oko pH = 3,7, zatim druge u širem pojasu između pH = 5,4 i 7, treće oko pH = 8 i četvrte oko pH = 9,4, kolin ( $5,8 \times 10^{-3}$  M) utječe efektorski samo na drugu djelatnost u neutralnom području, i to aktivirajući (oko 10% razgrađenog supstrata više). Na djelatnost oko pH = 9,5 magnezij djeluje aktivirajući i u nazočnosti kolina.

*Fosfataza bubrega.* Efektorski učinak kolina na znatno djelatnu fosfatazu bubrega istražili smo kod pH = 3,6, 5,2, 7, 8 i 9. Kolin ( $5,8 \times 10^{-3}$  M) djeluje inhibirajući na dvije djelatnosti fosfataze bubrega, i to manje izrazito (pri



duljem trajanju reakcije) kod  $\text{pH} = 5,2$  (oko 7% razgrađenog supstrata manje), a više (no samo u prva tri sata reakcionog vremena) na djelatnost u lužnatom reakcionom području kod  $\text{pH} = 8$  (oko 37% razgrađenog supstrata manje). Inhibirajući učinak kolina na lužnatu fosfatazu bubrega znatno je slabiji u nazočnosti magnezija (iznosi samo oko 10% razgrađenog supstrata manje). Po tome, što kolin (u kraćem reakcionom vremenu) djeluje inhibirajući na djelatnost fosfataze bubrega u lužnatom reakcionom području, naši se rezultati bitno razlikuju od rezultata Grangera i suradnika<sup>1</sup>, po kojima kolin (pri duljem trajanju reakcije) djeluje aktivirajući

*Fosfatasa uterusa.* Za fosfatazu uterusa istražili smo efektorsko djelovanje kolina kod  $\text{pH} = 3,7, 5,4, 7, 8$  i  $9,4$ . Kolin ( $5,8 \times 10^{-3}$  M) inhibira djelatnost fosfatase uterusa, jače kod  $\text{pH} = 7$  (oko 30% razgrađenog supstrata manje), a slabije u lužnatom području od  $\text{pH} = 8,2$  pa dalje (oko 12% razgrađenog supstrata manje).

*Fosfatasa placentae.* Efektorski učinak kolina na djelatnost fosfatase placentae, djelatne osobito izrazito u ekstremnije lužnatom reakcionom području, istražili smo pri  $\text{pH} = 3,7, 5,4, 7, 8,2$  i  $9,4$ . Kolin ( $5,8 \times 10^{-3}$  M) koči djelatnost fosfatase placentae, i to manje u kiselom reakcionom području između  $\text{pH} = 3$  i  $5$  (oko 10% razgrađenog supstrata manje), a osobito znatno u lužnatom području kod  $\text{pH} = 9,4$  (oko 30% razgrađenog supstrata manje); inhibirajući učinak kolina u tom području umanjuje se nazočnošću magnezija (iznosi oko 20% razgrađenog supstrata manje). Naprotiv, na djelatnost kod  $\text{pH} = 7$  kao da kolin djeluje blago aktivirajući.

*Fosfatasa kostiju.* Efektorsko djelovanje kolina na djelatnost fosfatase kostiju istražili smo samo u reakcionom području od  $\text{pH} = 7$  i dalje do gotovo  $10$ , jer se u tom području djelatnost spomenute fosfatase jedino i očituje. Kolin ( $1,4 \times 10^{-2}$  M) djeluje jako inhibirajući na fosfatazu kostiju. Inhibirajući učinak očituje se već kod  $\text{pH} = 7,8$  (oko 10% razgrađenog supstrata manje), a osobito je znatan u ekstremnije lužnatom reakcionom području kod  $\text{pH} = 9,8$  (oko 50% razgrađenog supstrata manje).

*Fosfatasa mlijeka.* Efektorski učinak fosfatase mlijeka istražili smo kod  $\text{pH} = 3,6, 5,2, 7, 8$  i  $9$ . Kolin ( $5,8 \times 10^{-3}$  M) blago aktivira po sebi slabu djelatnost fosfatase mlijeka, i to u kiselom području kod  $\text{pH} = 3,6$  i  $5,2$  i podjednako u lužnatom reakcionom području, no samo kod  $\text{pH} = 8$  (oko 8% razgrađenog supstrata više).

*Fosfatasa otrova zmije poskok.* Otopina osušenog otrova zmije poskok (*Vipera ammodytes*) ne hidrolizira glicerofosfat ni u jednom dijelu reakcionog područja između  $\text{pH} = 3,9$  i  $8,4^*$ .

Opisani rezultati prikazani su zajednički i u priloženoj preglednoj tabeli.

#### ZAKLJUČAK

Iz prikazanih se rezultata vidi, da gotovo sve upotrebene fosfatase (izuzevši otrov zmije poskok, koji uopće ne sadržava glicerofosfatazu) hidroliziraju i kolin- $\beta$ -glicerofosfat, kao i da kolin, koji se pritom nalazi u reakcionoj smjesi (u mol. konc. između  $5,8 \times 10^{-3}$  i  $1,4 \times 10^{-2}$  i pod našim pokusnim uvjetima) efektorski djeluje također na gotovo sve spomenute fosfatase (izuzevši samo

\* Unijeli smo taj podatak, jer ga u literaturi nismo našli zabilježena.



Na sve ostale istražene fosfataze, odnosno njihove pojedinačne djelatnosti kolin djeluje ili samo aktivirajući (fosfataze plijesni *Aspergillus niger*, krumpira, ejakulata, mokraće, jetre, kostiju i mlijeka) ili samo inhibirajući (fosfataze bubrega i uterusa). Kao naročito značajno za efektorsko djelovanje kolina valja istaknuti njegov aktivirajući učinak na djelatnost pretežnog broja istraženih fosfataza u neutralnom reakcionom području (izrazito, i to suprotno, t. j. inhibirajući, djeluje kolin samo na fosfatazu uterusa, a u lužnatijem području i na fosfatazu bubrega). Isto je tako značajno, da kolin ne djeluje inhibirajući na

## ABSTRACT

**Effect of Choline on Phosphatases Investigated with Choline- $\beta$ -glycerophosphate as Substrate***A. Režek and N. Škarica*

The action of the phosphatases from different sources (yeast, *Aspergillus niger*, castor bean, potato, serum, prostate gland, sperm, urine, liver, kidney, uterus, placenta, bone, milk, and the poison of *Vipera ammodytes*) on choline- $\beta$ -glycerophosphate has been investigated, as well as the action of choline on the phosphatase activity, and the results compared with the enzymatic hydrolysis of sodium glycerophosphate as the standard substrate. Almost all the phosphatases which have been investigated (with the only exception of the poison of *Vipera ammodytes*, which has no phosphatase activity) hydrolyze choline- $\beta$ -glycerophosphate as well, and all of them, except the phosphatase of serum, are acted upon by choline, which in our experiments results from the dissociation of the substrate. Choline, in a concentration of  $5,8 \cdot 10^{-3}$  M to  $1,4 \cdot 10^{-2}$  M, has an effect not only on a particular phosphatase activity but it also acts on various isodynamic enzymes simultaneously in different ways, its action varying both qualitatively (activation or inhibition) and quantitatively. The following results have been obtained with various enzymes. The phosphatase activity of yeast is strongly inhibited by choline in an acid medium, but from pH 5 towards neutrality an activating effect of choline can be observed. Similar behaviour has been found with the phosphatases of placenta, prostate gland and castor bean, the activating effect of choline being shifted towards alkalinity with the two last mentioned enzymes. The other phosphatases investigated are either activated (*Aspergillus niger*, potato, sperm, urine, liver, bone, and milk) or inhibited (kidney and uterus) by choline at all pH's. For choline it is characteristic to show a general activating effect at neutrality, the opposite, i. e. inhibiting effect being found only with the enzymes of uterus and, in a more alkaline medium, of kidney. It is also characteristic for choline that it does not inhibit the sperm phosphatase in an acid medium, and that it activates it at higher pH's, which is probably connected with the supposed physiological function of the sperm phosphatase. Of all the effects of choline on the phosphatases quantitatively the most pronounced are the inhibition of the phosphatases of yeast (at acid pH), kidney, uterus, and placenta (at alkaline pH), and the activation of the phosphatases of castor bean and bone (at alkaline pH).

As to the action of choline on kidney phosphatase at alkaline pH, which we have found to be inhibitory during the first 3 hours of reaction time, our results do not agree with those of Granger et al., according to whom choline, at longer reaction time, has an activating effect.

DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
FACULTY OF VETERINARY SCIENCE,  
ZAGREB, CROATIA

Received, November 4, 1952.