

А. Д. БРАУН и Н. Л. ФЕЛЬДМАН

ТОКСИЧНОСТЬ КРАСИТЕЛЕЙ И СВЯЗЫВАНИЕ ИХ НАТИВНЫМИ БЕЛКАМИ

(Представлено академиком Л. А. Орбели 26 VII 1949)

Многие красители являются биологически активными веществами. Особенно широко известны их бактерицидные свойства. Еще в 1902 г. Михаэлис (1) писал, что достаточно концентрированные растворы красителей всегда стерильны, так как они являются ядами для протоплазмы. Исследование токсического действия красителей посвящено много работ. Значение этих исследований определяется не только широким применением красителей в биологии и медицине для прижизненного окрашивания клеток и тканей или в качестве лекарственных средств, но также и тем, что связывание красителей протоплазмой обычно рассматривают как модель других реакций взаимодействия живого субстрата: красители окрашены и являются как бы мечеными веществами. Это представляет важное удобство в методическом отношении.

Проблема токсического, фармакологического действия веществ является, несомненно, очень сложной. Конечный результат взаимодействия химического агента и живого субстрата может быть осложнен многими причинами: скоростью проникновения и выведения веществ, характером их отложения в клетке (диффузным или гранулярным), эффективностью реакций дезинтоксикации и т. д. Однако особенно существенное значение должно иметь связывание химического агента протоплазмой и, в частности, ее белковой частью, так как жизненные центры клетки являются, повидимому, чувствительными белковыми системами. Наша работа и посвящена изучению связи между токсичностью красителей и их способностью связываться нативными белками.

Можно было уже заранее предполагать, что механизм токсического действия красителей должен быть неодинаков для представителей различных химических групп. Например, высокая токсичность красителей трифенилметанового ряда связана, вероятно, с взаимодействием центрального углерода этих красителей с SH- и NH₂-группами белков. Токсические свойства других красителей могут быть объяснены их способностью к окислению и т. д. Для многих красителей, однако, неизвестны легкие химические превращения. По всем данным, эти красители и не подвергаются каким-либо существенным изменениям при своем действии на клетку. Так как имеются основания утверждать, что токсичность красителей усиливается с уменьшением их диссоциации, то можно предполагать, что в действии красителей, кроме избирательного, химического эффекта, могут обнаружиться и элементы неспецифического, неэлектролитного, наркотического действия (2). Однако ясно, что в таких сложных веществах, как красители, закономерности, найденные для простых неэлектролитов, могут быть заслонены содержащимися активными химическими группами, электростатическими зарядами и т. д.

При изучении действия красителей влияние этих осложняющих обстоятельств может быть сведено к минимуму (или по крайней мере нивелировано), если производится сравнение близких по химическому строению красителей.

В нашей работе токсичность красителей и связывание их белками изучались поэтому в пределах гомологических рядов красителей. Всего было исследовано 14 основных витальных красителей, относящихся к 5 химическим группам: I — трифенилметановые (малахитовый зеленый, кристаллический фиолетовый и фуксин); II — оксазиновые (нильский голубой хлористоводородный и сернокислый и яркий крезильовый синий); III — азиновые (таннингелиотроп, сафранин и нейтральный красный); IV — тиазиновые (метиленовый, синий, толуидиновый синий); V — ксантеновые (иризамин, пиронин, родамин).

Препараты первых шести красителей подвергались очистке и были химически чистыми. В остальных случаях мы пользовались продажными препаратами. Токсичность красителей определялась нами по отношению к портняжной мышце лягушки. Мышца помещалась в раствор красителя; через определенные промежутки времени определялся порог возбудимости (3). На рис. 1 представлено изменение возбудимости мышцы как функция времени.

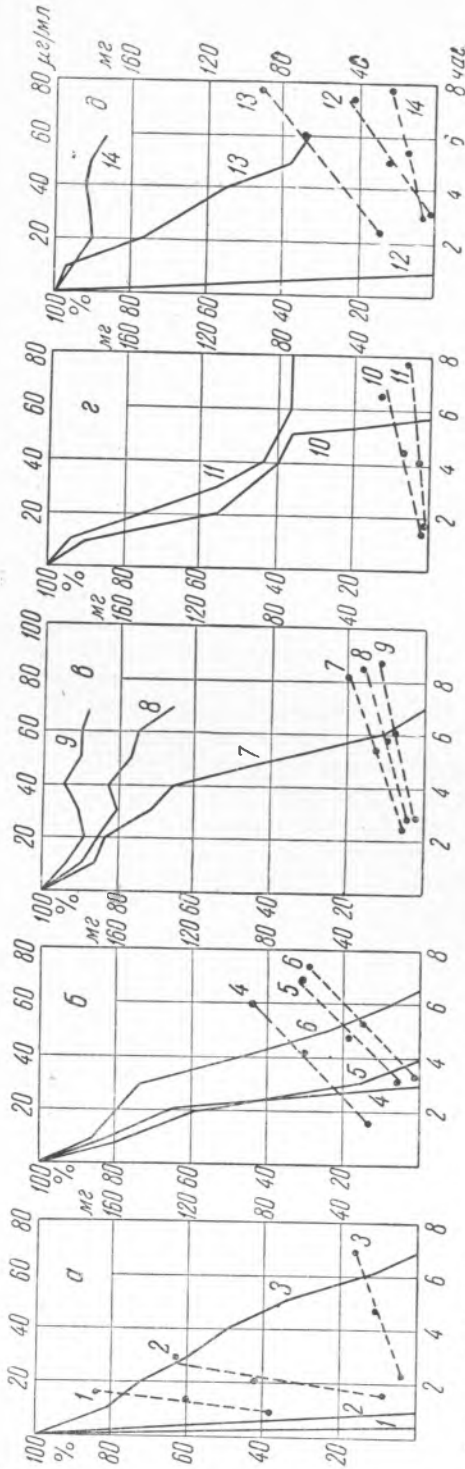


Рис. 1. Связывание красителей нативным миозином и токсическое действие красителей на мышцу. Сплошные кривые — изменение токсичности (по оси абсцисс снизу — время в часах; по оси ординат слева — порог возбудимости в %). Пунктирные кривые — связывание красителя белком (по оси абсцисс сверху — концентрация свободного красителя в $\mu\text{г}/\text{мг}$, по оси ординат справа — количество красителя в мг , связанного 1 г белка). 1 — малахитовый зеленый, 2 — кристаллический фиолетовый, 3 — фуксин, 4 — nilьский голубой хлористоводородный, 5 — nilьский голубой сернокислый, 6 — яркий крезильовый синий, 7 — таннингелиотроп, 8 — сафранин, 9 — нейтральный красный, 10 — метиленовый синий, 11 — толуидиновый синий, 12 — иризамин, 13 — пиронин, 14 — родамин

наглядности на тех же графиках приведены данные по связыванию красителей миозином (лягушки), которое определялось методом диф-

фузии свободного красителя в желатину из смеси его с белком (4). Из графиков видно, что в пределах исследованных групп красителей наблюдается совершенно отчетливое совпадение между рядом токсичности красителей и рядом тех же красителей по их способности связываться миозином. Так, в трифенилметановой группе (рис. 1, а) красители по токсичности располагаются в ряд: малахитовый зеленый > кристаллический фиолетовый > фуксин. Совершенно такой же ряд установлен и для связывания этих красителей миозином*. В оксазиновой группе (рис. 1, б) нильский голубой хлористоводородный токсичнее нильского голубого серноокислого, последний токсичнее яркого крезилового синего. В такой же последовательности эти красители располагаются и по связыванию их миозином. Аналогичные отношения существуют и для дру-

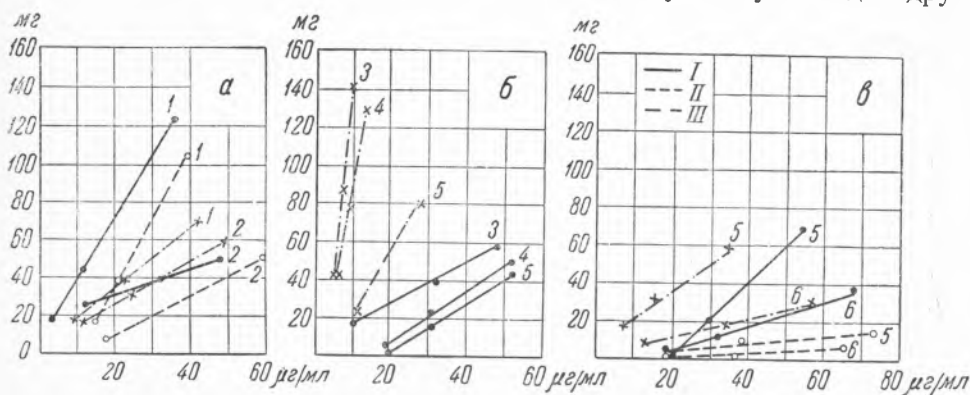


Рис. 2. Связывание красителей миозином (I), яичным глобулином (II) и яичным муцином (III). По оси абсцисс отложена концентрация свободного красителя в $\mu\text{г}/\text{мл}$, по оси ординат — количество красителя в мг, связанное 1 г белка. 1 — кристаллический фиолетовый, 2 — фуксин, 3 — нильский голубой хлористоводородный, 4 — нильский голубой серноокислый, 5 — яркий крезильовый синий, 6 — иризамин, 7 — ромдин

гих групп (рис. 1, в, г, д). Мы наблюдали отклонение от этого правила только в одном случае — для пиронина, который, несмотря на малую токсичность, сильнее других красителей своего ряда связывается миозином (рис. 1, д). Корреляция между токсическими свойствами красителей и их способностью соединяться с белками существует не только по отношению к миозину, но и к другим белкам — яичному глобулину и яичному муцину** (рис. 2, а, б, в).

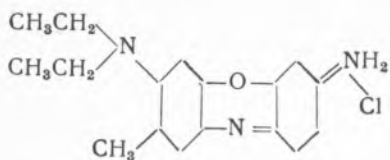
Существование рядов красителей по сродству их к белкам показывает ясно, что мы встречаемся здесь с проявлением различной химической реактивности красителей. Повторение тех же рядов по токсическим свойствам заставляет предположить, что и здесь мы имеем дело с той же закономерностью. Нельзя сомневаться в том, что в основе усиления сродства красителей к белку лежит целый ряд не одинаковых для разных белков и красителей причин. Здесь может быть и прямое улучшение взаимодействия гидрофобных участков молекул красителя с неполярными группами белка (5), и косвенное: благодаря изменению протолитических свойств красителя, изменению внутрионизированных его структур и т. д.

Рассмотрим, например, структуры красителей в пределах некоторых исследованных рядов. В основе реакционной способности красителей трифенилметановой группы, несомненно, лежит реакция положительно

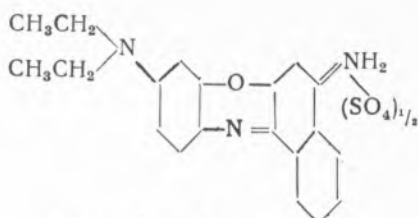
* Трифенилметановые красители образуют такой же ряд и по способности вступать во взаимодействие с аминокислотами, в частности, с цистеином.

** В разных опытах обнаруживаются небольшие варианты в количестве красителя, связанного с 1 г белки (например, рис. 1, а и 2, а). Это зависит, по видимому, от разной концентрации белка в этих опытах (4).

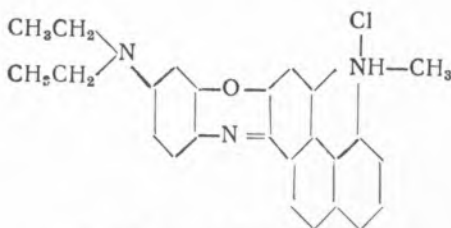
заряженного центрального атома углерода. Поэтому реактивность красителей этого ряда будет тем выше, чем выше удельный вес соответствующих ионных структур красителя (6). Известно, что удельный вес структур, содержащих C^+ в центре, должен быть наивысшим для малахитового зеленого, меньше для кристаллического фиолетового и меньше



яркий крезиловый синий¹



нильский голубой серноокислый



нильский голубой хлористоводородный

всего для фуксина. Сопоставляя между собой строение яркого крезилового синего и нильского голубого, мы видим, что нильский голубой в отличие от яркого крезилового синего содержит лишнее бензольное кольцо. Нильский голубой хлористоводородный содержит два бензольных кольца. Таким образом, увеличение в молекуле числа неполярных гидрофобных групп, в данном случае фенильных, совпадает с увеличением токсичности вещества и увеличением связывания его белками*.

Энергичное связывание красителей нативными белками позволяет предположить, что белковый компонент протоплазмы может быть ответственным за накопление в клетке красителей и других биологически активных веществ. Однако и независимо от природы субстрата, с которым может идти связывание красителей в клетке (это могут быть и белки, и липоиды, и нуклеиновые соединения), и от характера связи мы видим, что в существовании корреляции между химической активностью красителей и их биологическим действием могут быть вскрыты влияния, давно и хорошо известные для более простых электролитов и неэлектролитов (2).

Существование установленной Д. Н. Насоновым и В. Я. Александровым (7) зависимости между рядом неэлектролитов по их токсичности и способности адсорбироваться на мицеллярных поверхностях протоплазмы обязано, как указывает Н. В. Лазарев (2), тем же влияниям.

Институт экспериментальной медицины
Академии медицинских наук СССР

Поступило
16 VII 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. Michaelis, Einführung in die Farbstoffchemie für Histologen, Berlin, 1902.
² Н. В. Лазарев, Неэлектролиты, Л., 1944. ³ Н. Л. Фельдман, ДАН, 59, 961 (1948). ⁴ А. Д. Браун, Биохимия, 13, 409 (1948). ⁵ Д. Л. Галмуд, ЖФХ, 15, 532 (1941). ⁶ Дж. У. Уэлленд, Теория резонанса, М., 1948. ⁷ Д. Н. Насонов и В. Я. Александров, Биол. журн., 6, 117 (1937). ⁸ А. Н. Roffo у О. Calcaño, Vol. med. exper. para el estudio trat. del cancer, 7, 651 (1930).

* О влиянии аниона на свойства красителей см. (8).