

Д. Л. РУБИНШТЕЙН, Л. Т. ТУТОЧКИНА и Е. Д. ГРИЩЕНКО

ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭРИТРОЗИНА
НА СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ МЫШЦ

(Представлено академиком А. И. Опарным 21 XI 1950)

Облучение лучами видимой части спектра биологических субстратов, систем и целых организмов в присутствии некоторых красок и молекулярного кислорода ведет к их разрушению вследствие фотосенсибилизированного окисления⁽¹⁾. Последнее имеет немаловажное практическое и теоретическое значение^(2, 3).

Задачей настоящей работы было выяснить интимный механизм фотодинамического действия эритрозина на мышцы путем сопоставления собственных опытов на сократительных мышечных белках с литературными данными, касающимися целой мышцы. Как известно, икроножная мышца лягушки, освещаемая в присутствии эритрозина или гематопорфина, претерпевает, во-первых, медленное постепенное сокращение и, во-вторых, на фоне этой необратимой контрактуры ряд одиночных сокращений⁽⁴⁾. Такую же картину дает и безнервная гладкая мышца амниона птиц⁽⁵⁾.

Объектами нашего исследования явились препараты миозина⁽⁶⁾, актина^(7, 8) и натурального актомиозина (95—100% активности⁽⁹⁾). В качестве красителя-сенсибилизатора применялся эритрозин в концентрациях до 10^{-4} М. Источником света служила электрическая лампа. Между лампой и открытым бюксом, в котором помещался раствор, ставился кристаллизатор с холодной проточной водой для поглощения тепловой части спектра. Как показала проверка, ни свет, ни эритрозин порознь не вызывали в белковых растворах никаких заметных изменений. Опыты велись при комнатной температуре, колебания которой не влияли существенным образом на скорость фотодинамических процессов.

Результаты опытов сводятся к следующему.

По мере облучения в присутствии эритрозина, во-первых, вязкость актомиозина повышается вплоть до полного застудневания и, во-вторых, актомиозин постепенно утрачивает гидрофильность. Первый процесс обратим: при встрияхивании студень разжижается и образуется вновь при повторном облучении. Утрата гидратационных свойств, являющаяся следствием коагуляции, необратима. При установлении зависимости эффективного времени облучения от концентрации эритрозина или белка мы избрали такую степень дегидратации, при которой после 20 мин. центрифугирования (2800 об/мин) поверх раствора появляется тонкий диск совершенно прозрачной жидкости (содержащей, однако, судя по реакции с трихлоруксусной кислотой, белок). Этот показатель прекрасно воспроизводится. Как видно из табл. 1, обратимое застудневание и необратимая дегидратация суть явления, между собой не связанные.

На рис. 1 дана кривая зависимости времени облучения, необходимого для наступления дегидратации актомиозина, от концентрации эритрозина, а на рис. 2 — от концентрации белка. Как видно из рис. 1, количе-

ство световой энергии (прямая пропорциональная времени облучения), которое требуется для осуществления процесса дегидратации, находится в гиперболической зависимости от концентрации краски (следовательно, скорость этого процесса — в линейной зависимости). Из рис. 2 вытекает, что количество световой энергии, дегидратирующее одно и то же количество белка, всегда одинаково и не зависит от концентрации фотокатализатора.

Таблица 1

Минимальная длительность облучения, необходимая для застудневания и дегидратации растворов актомиозина, в минутах (концентрация эритрозина $2,3 \cdot 10^{-5} M$)

Концентрация белка в мг/мл	Застудневание	Дегидратация
4,5	—	11,5
3,8	< 8	9,5
3,0	5	8,25
1,5	20	6
0,75	Не застудневает	4,5
0,37	То же	3,5

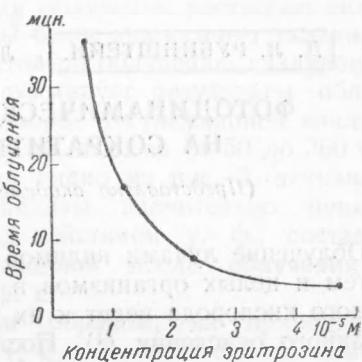


Рис. 1. Зависимость времени облучения, вызывающего дегидратацию, от концентрации эритрозина

Вязкость облученного в присутствии краски раствора актомиозина, измеренная в вискозиметре Оствальда, необратимо падает ниже величины, достигаемой после добавления 0,015% аденоциантифосфорной кислоты (АТФ): $\eta_{уд}$ (исходная) = 2,25, $\eta_{уд}$ (+ АТФ) = 0,69, $\eta_{уд}$ (облучение) = 0,40. Последняя величина получается не сразу: в начале измерения $\eta_{уд}$ (облучение) = 2,61 и лишь через несколько минут, после того как раствор многократно пропускался через капилляр вискозиметра, устанавливается на 0,40. Это говорит об утрате ферментативной активности и о распаде комплекса.

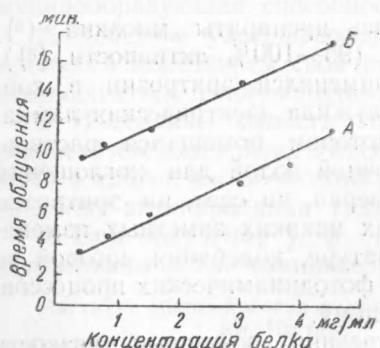


Рис. 2. Зависимость времени облучения, вызывающего дегидратацию актомиозина, от концентрации актомиозина. А — концентрация эритрозина $2,3 \cdot 10^{-5} M$, Б — концентрация эритрозина $1,25 \cdot 10^{-5} M$

При облучении миозина в присутствии эритрозина вязкость его повышается, появляется осадок в виде обрывков студня, а затем наступает полное застудневание. Гель после встряхивания не разжижается подобно актомиозину, а сбивается в комки. В отличие от того, что мы имели в опытах с актомиозином, при центрифугировании облученных растворов миозина прозрачный слой жидкости не отделяется.

У фибрillярного актина после облучения с эритрозином удельная вязкость снижается до вязкости солевого раствора (см. табл. 3), и одно-

временно утрачивается способность образовывать комплекс с миозином (см. табл. 4).

Таблица 2

Фотодинамическое действие на ферментативную активность миозина А (концентрация белка 2 мг/мл)

Концентрация эритрозина в М	Время облучения в мин.	Ферментативная активность γ Р/мг белка
$5 \cdot 10^{-5}$	0	135
$5 \cdot 10^{-5}$	60	0
0	0	150
0	60	147

Таблица 3

Влияние облучения в присутствии эритрозина на вязкость растворов актина (концентрация белка 1 мг/мл, концентрация эритрозина $2.5 \cdot 10^{-5}$ М)

Время облучения в мин.	Уд. вязкость
0	0,30
30	0,12
60	0,03
90	0,00

Целью опытов, приведенных в табл. 5, было выяснить, не объясняется ли понижение вязкости облученных в присутствии эритрозина растворов актина переходом последнего из фибриллярной формы в глобулярную. Для этого к опытным пробам добавлялся миозин из расчета 1 мг на 1,6 мг актина. Если бы актин при облучении перешел в глобулярную форму, не потеряв способности реагировать с миозином, то весь миозин оказался бы связанным, и последующее добавление необлученного актина уже не привело бы к образованию более вязкого комплекса.

Из табл. 5 видно, что миозин, добавленный к облученному актину, остается свободным. Следовательно, мы имеем здесь дело не с переходом фибриллярного актина в глобулярный, а с потерей этим белком нативности. Раствор актина, облученный в присутствии эритрозина, остается прозрачным и гомогенным, при центрифугировании осадка не обнаруживается.

Таким образом, сократительные мышечные белки — актин и миозин — при освещении их растворов в присутствии краски изменяются однозначным образом: они необратимо утрачивают свои нативные свойства. Значительно больший интерес представляет поведение их комплекса — актомиозина. Последний, как мы видели, реагирует двояко: имеют место обратимое застудневание и необратимая коагуляция. Соотношение этих процессов таково, что на фоне необратимой коагуляции, проявляющейся в возрастающей по мере освещения утрате гидрофильности, можно получить, попеременно облучая и встряхивая раствор, обратимое его застудневание (до нескольких раз). Мы склонны думать, что оба эти процессы (и коагуляция и застудневание) лежат в основе

Таблица 4

Утрата облученным в присутствии краски актином способности реагировать с миозином (концентрация актина 4,4 мг/мл, миозин добавлялся в виде 0,5 мл раствора с концентрацией 5—8 мг/мл; для определения вязкости пробы разбавлялись в 13 раз 0,6 М раствором KCl)

№ пробы	Концентрация эритрозина в М	Время облучения в мин.	Уд. вязкость	
			до добавл. миозина	после добавл. миозина
1	0	0	0,11	1,36
2	$5 \cdot 10^{-5}$	0	0,12	1,35
3	0	60	0,11	1,36
4	0	120	0,12	1,38
5	$5 \cdot 10^{-5}$	60	0,01	0,72
6	$5 \cdot 10^{-5}$	120	0,00	0,43
Солевой раствор без белка	$5 \cdot 10^{-5}$	0	0,00	0,43

поведения в подобных условиях целой мышцы. Такое же обратимое застудневание, как известно, возникает не только как следствие фотодинамического облучения, но и под действием АТФ по схеме (11):

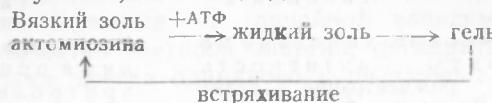


Таблица 5

Утрата облученным в присутствии эритрозина актином способности образовывать с миозином вязкий, реагирующий на АТФ комплекс (концентрация эритрозина $2,5 \cdot 10^{-6} M$, конечная концентрация АТФ 0,02%; опытная проба (Оп) облучалась 90 мин., контрольная (К) не облучалась)

Пробы	Уд. вязкость	
	до добавл. АТФ	после добавл. АТФ
К + миозин	0,37	0,15
Оп + миозин	0,14	0,14
К + миозин + Оп (через 5 мин. после перемешивания)	0,38	0,19
Оп + миозин + К (через 5 мин. после перемешивания)	0,37	0,19

химических групп, ответственных за механизмы застудневания и коагуляции, то мы считаем возможным рассматривать в качестве таковых для процесса застудневания сульфогидрильные группы, окисление которых в миозине (13-15) приводит к обратимой инактивации его ферментных свойств. Второй процесс может быть обусловлен фотосенсибилизированным окислением тирозина и триптофана, поскольку из всех аминокислот ароматические подвергаются фотодинамическому действию в первую очередь и вместе с тем, как это было недавно установлено, активно участвуют в ферментных реакциях (16).

После того как была выполнена и написана настоящая работа, в ДАН появилась статья В. А. Энгельгардта, Н. С. Демяновской и Т. В. Венкстери, в которой наши опыты с миозином нашли полное подтверждение (17); совпадли также и взгляды относительно вероятного участия в процессе застудневания миозина сульфогидрильных групп.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
16 IX 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 А. Н. Теренин, Фотохимия красителей. М., 1949.
- 2 В. В. Ефимов, Усп. совр. биол., 1, 382 (1922).
- 3 Н. F. Blum, Photodynamic Action, 1941.
- 4 F. Lipray, Pfl. Arch., 222, 616 (1929).
- 5 G. Boehm, Helv. Physiol. Pharmac. Acta, 4, 8 (1946).
- 6 J. P. Greenstein and J. C. Edsall, Journ. Biol. Chem., 133, 317 (1940).
- 7 А. Сент-Джордьи, О мышечной деятельности, М., 1947.
- 8 G. Feuerer, F. Molnar, E. Pettko and F. B. Straub, Hung. Acta Physiol., 1, 150 (1948).
- 9 J. Banga and A. Szent-Györgyi, Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged, 1, 5 (1942).
- 10 М. Н. Любимова и В. А. Энгельгардт, Биохимия, 4, 716 (1939).
- 11 М. Гинзбург и Б. Гольдштейн, Бюлл. эксп. биол. и мед., 25, 438 (1948).
- 12 G. Boehm, Zs. Vitaminforsch., 11, 128 (1941).
- 13 M. Ziff, Journ. Biol. Chem., 153, 25 (1944).
- 14 E. S. G. Barron and T. P. Singer, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 56, 120 (1944).
- 15 F. Binkley, S. M. Ward and C. L. Hoasland, Journ. Biol. Chem., 155, 681 (1944).
- 16 Х. М. Равикович, О. Н. Сеткина и К. Д. Леонтьева, ДАН, 60, 939 (1948).
- 17 В. А. Энгельгардт, Н. С. Демяновская и Т. В. Венкстери, ДАН, 72, 323 (1950).