

Т. М. ТУРПАЕВ

О СПОСОБЕ ДЕЙСТВИЯ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ЯДОВ ПО ОПЫТАМ С РАДИОАКТИВНЫМ СЕРЕБРОМ

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 17 XII 1953)

Работами последних лет установлено, что сульфгидрильные группы являются одними из наиболее реактивных полярных групп в составе белковой молекулы. Показана чрезвычайно важная роль SH-групп в структурных превращениях и свойствах белковых тел. При воздействии химическими реактивами (так называемыми сульфгидрильными или тиоловыми ядами), взаимодействующими с SH-группами, на белки, структура последних изменяется и они утрачивают свои специфические свойства. Таков, например, механизм действия тиоловых ядов на белки, обладающие ферментативной активностью. Нарушением структуры тканевых белков объясняется тормозящее действие тиоловых ядов на многие сложные физиологические процессы (1-6).

В последнее время значительно повысился интерес к расшифровке механизма действия тиоловых ядов на животный организм в связи с разработкой терапии отравлений животных и человека тяжелыми металлами, а также некоторыми отравляющими веществами, являющимися ингибиторами SH-групп (люизит, лакриматоры и др. (7)).

Процессы, нарушенные тиоловыми ядами, образующими меркаптидную связь с сульфгидрильными группами, сравнительно легко вновь могут быть восстановлены при восстановлении исходной структуры белковых тел соединениями, содержащими в своей молекуле свободные SH-группы, например цистеином (2, 3), SH-глутатионом (3), димеркаптопропанолом (6), а также веществами, высвобождающими SH-группы, находящиеся внутри белковой частицы в неактивном состоянии. Большой экспериментальный материал в этом направлении приведен в работах сотрудников лаборатории Х. С. Коштоянца (2-6).

В настоящей работе приведены опыты по изучению механизма действия сравнительно мало изученного тиолового яда — ионов серебра — на сократительный акт сердечной мышцы лягушек. В части опытов использовалось радиоактивное серебро Ag^{110} .

Прежде всего нами была исследована специфичность взаимодействия ионов серебра с SH-группами цистеина количественным методом титрования цистеина нитропруссидом натрия (2). В кювету фотоколориметра

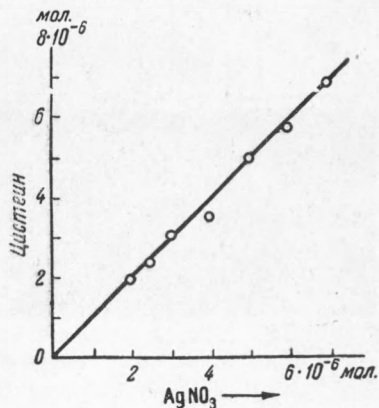


Рис. 1. Зависимость между количеством $AgNO_3$ и цистеина, прошедших на реакцию взаимодействия

наливались водные растворы, содержащие $2-7 \cdot 10^{-6}$ мол. цистина, $2-7 \cdot 10^{-6}$ мол. AgNO_3 и 0,5 мл 8% раствора нитропруссид натрия. Общий объем жидкости был равен 6 мл. Кювета помещалась в фотоколориметр. Затем добавлялись 2 капли концентрированного раствора NH_4OH . Интенсивность появившейся окраски определялась по смещению стрелки гальванометра. Так как окраска раствора постепенно исчезала, то отсчет всегда производился через 10—15 сек. после прибавления NH_4OH . По показанию гальванометра вычислялось количество цистина в растворе, а по разности с исходным количеством — количество цистина, пошедшее на реакцию взаимодействия с AgNO_3 .

Полученные данные изображены на рис. 1, из которого следует, что на взаимодействие с каждым молем AgNO_3 идет около 1 моля цистина. Следовательно, реакция между AgNO_3 и цистеином идет по схеме:



цистеин

Было испытано влияние аминокислот: аланина, лизина, глутаминовой кислоты, цистина, триптофана, тирозина, а также пептона на реакцию

взаимодействия цистина с AgNO_3 . Оказалось, что даже стократное превышение любого из этих веществ по сравнению с количеством цистина не влияет на эту реакцию. Следовательно, при действии на смесь аминокислот, а также на белковые субстраты ионы серебра взаимодействуют, по видимому, только с SH-группами.

Опыты с влиянием AgNO_3 на функциональное состояние сердечной мышцы были проведены при одновременной регистрации сокращений миокарда обычным рычажным методом и интенсивности излучения поглощенных тканью желудочка атомов Ag^{110} . Для этого изолированный на канюле и сокращающийся от индукционных ударов желудочек сердца лягушки закреплялся на штативе на расстоянии 1 см от счетной трубки Гейгера — Мюллера. Раствор $\text{Ag}^{110}\text{NO}_3$

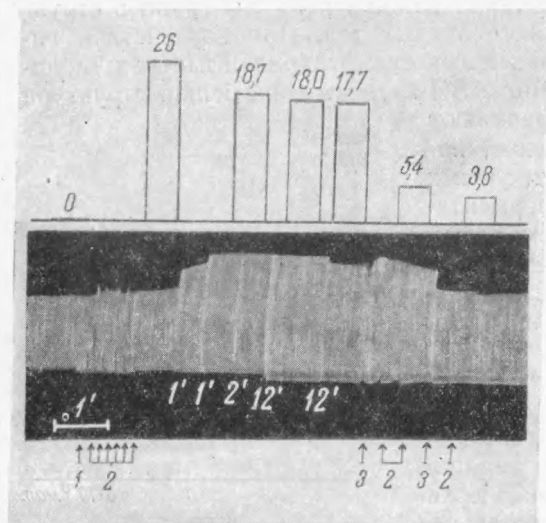


Рис. 2. Влияние кратковременного действия AgNO_3 на сокращения желудочка лягушки. 1 — введение в канюлю $\text{Ag}^{110}\text{NO}_3$ в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ на 15 сек.; 2 — промывание раствором Рингера; 3 — введение цистина $5 \cdot 10^{-4}$. Столбики и цифры сверху — количество аккумулярованного тканью серебра в $\gamma/\text{г}$ ткани. Цифры внизу кимограммы — время остановки кимограммы

готовился на растворе Рингера следующим образом. 0,01% раствор $\text{Ag}^{110}\text{NO}_3$ с удельной активностью $5,9 \cdot 10^{-4}$ мCu/мг Ag^{110} , смешивался с равным объемом раствора, содержащего удвоенное по сравнению с нормальным раствором Рингера количество солей NaCl , KCl , CaCl_2 и NaHCO_3 . Смесь немедленно вводилась в сердечную канюлю. При таком способе приготовления раствора AgNO_3 появлялась лишь слабая муть, так как серебро полностью не успевало выпасть в осадок в виде хлопьев AgCl . Такой раствор быстрее оказывал физиологический эффект, чем раствор, приготовленный заранее. После введения в канюлю $\text{Ag}^{110}\text{NO}_3$ на определенный срок сердце тщательно промывалось раствором Рингера (5—10 раз). По интенсивности излучения судили о количестве серебра.

аккумулированного миокардом желудочка. Количество аккумулированного сердечной мышцей серебра, вычисленное в гаммах AgNO_3 на 1 г ткани, изображалось в виде столбиков и цифр вверху кимограмм.

Обработка миокарда раствором AgNO_3 в разведении $5 \cdot 10^{-5}$ в течение 10—30 сек. вызывает усиление сердечной деятельности, длящееся час — полтора и более. Количество серебра, аккумулированное мышцей, соответствует примерно 10—20 γ AgNO_3 на 1 г ткани. Промывание сердца раствором Рингера не оказывает влияния на силу сердечных сокращений и лишь незначительно уменьшает количество серебра, аккумулированное тканью. Введение цистеина ($1 \cdot 10^{-3}$) или 2,3-димеркаптопропанола ($1 \cdot 10^{-4}$) восстанавливает исходную амплитуду сокращений желудочка и снижает количество серебра в ткани (см. рис. 2). При большей

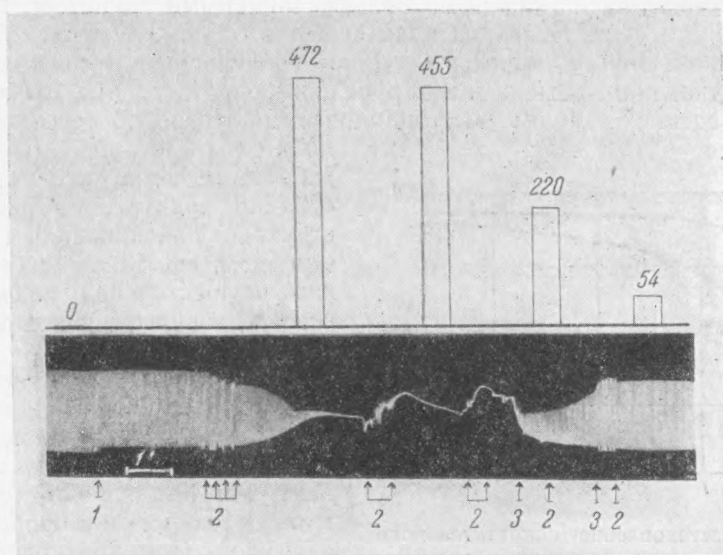


Рис. 3. Изменение сократительных свойств желудочка лягушки при действии $\text{Ag}^{110}\text{NO}_3$. 1 — введение в канюлю AgNO_3 в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ на 3 мин. Остальные условные обозначения те же, что на рис. 2

длительности действия серебра на миокард (в течение 30—40 сек.) сердечная мышца аккумулирует большее количество ионов серебра. Наступает временное угнетение сердечных сокращений, после которого желудочек восстанавливает свою работу, причем амплитуда сокращений нередко превышает исходную.

Увеличивая еще более время воздействия AgNO_3 на желудочек до двух и более минут, мы наблюдали после латентного периода (2—3 мин.) резкое угнетение сердечных сокращений и контрактуру. Количество аккумулированного мышцей серебра достигает 30—100 и более гамм AgNO_3 на 1 г ткани. Многократное промывание сердца раствором Рингера не восстанавливает сердечных сокращений. Количество серебра в сердечной мышце при промывании раствором Рингера уменьшается незначительно. Промывание сердца раствором цистеина $1 \cdot 10^{-3}$ или раствором 2,3-димеркаптопропанола восстанавливает сокращения сердечной мышцы и резко снижает количество серебра в миокарде (см. рис. 3). Следует отметить, что промывание раствором как цистеина, так и 2,3-димеркаптопропанола полностью не отмывает серебро из ткани. Часть ионов Ag попрежнему остается прочно связанной с тканью.

Переход радиоактивного серебра из связанного с мышцей состояния в раствор цистеина был изучен следующим образом. Миокард был обрабо-

тан раствором $\text{Ag}^{110}\text{NO}_3$ в течение 80 сек. Наступало угнетение сердечных сокращений, контрактура. Затем в канюлю вводился на 10 сек. 1 мл раствора цистеина $1 \cdot 10^{-3}$. Через 10 сек. раствор цистеина заменялся новым и т. д. в течение 1—4 мин. В каждой пробе определялось количество серебра по интенсивности излучения Ag^{110} . Сумма полученных результатов выражает общее количество, перешедшее из связанного с тканью состояния в раствор цистеина. На рис. 4 изображена кривая б увеличения количества ионов серебра, перешедших из связанного с мышцей состояния в перфузат, в зависимости от времени соприкосновения миокарда с раствором цистеина. Кривая а — амплитуда сокращений миокарда в процентах от нормы.

Приведенный экспериментальный материал показывает, что ионы серебра весьма специфично взаимодействуют с SH-группами цистеина, а также, вероятно, с тканевыми сульфгидрильными группами. При введении AgNO_3 в полость сердца ионы серебра взаимодействуют с SH-группами белков и других тканевых тиоловых соединений, что приводит к нарушению тканевого обмена и к нарушению сократительных свойств миокарда. Введение цистеина восстанавливает нарушенную серебром функцию. Опыты с радиоактивным серебром наглядно показывают, что цистеин конкурентно взаимодействует с фиксированным тканью серебром, восстанавливая важные для осуществления сократительного акта сульфгидрильные группы.

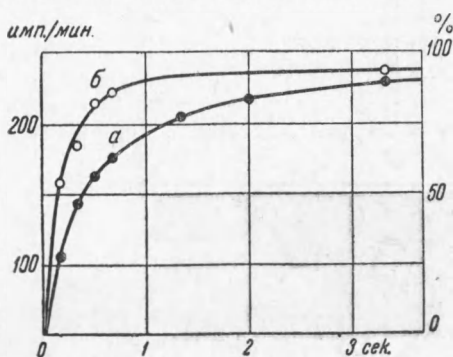


Рис. 4. Восстановление сократительного акта миокарда (а) и увеличение содержания Ag^{110} в перфузате (б) при введении в канюлю цистеина в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$

количество ионов серебра, блокируются, повидимому, наиболее реактивные тканевые SH-группы. В результате этого происходит своеобразная интенсификация связанных с сократительным актом мышцы процессов обмена веществ. При более длительном действии на желудочек лягушки большее количество тканевых SH-групп, взаимодействует с серебром, что приводит к глубокому нарушению тканевого обмена веществ и, соответственно, к угнетению сократительных свойств миокарда. Весьма вероятно, что это угнетение сокращений происходит вследствие нарушения ионами серебра важнейшего энергетического процесса — распада аденозинтрифосфата под влиянием фермента аденозинтрифосфатазы, который, по данным В. А. Энгельгардта и М. Н. Любимовой⁹⁾, инактивируется при действии ионов серебра.

Институт морфологии животных
им. А. Н. Северцова
Академии наук СССР

Поступило
16 IV 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. Rarkine, C. R. Soc. Biol., **112**, 1294 (1933). ² Т. М. Турпаев, Биохимия, **16**, 611 (1951). ³ Х. С. Коштоянц, Белковые тела, обмен веществ и нервная регуляция, М., 1951. ⁴ Г. Д. Смирнов, А. Л. Бызов, Ю. И. Рампан, ДАН, **87**, 155 (1952). ⁵ Х. С. Коштоянц, Т. М. Турпаев, ДАН, **57**, 181 (1946). ⁶ Т. М. Турпаев, Тр. Ин-та морфол. животн. им. А. Н. Северцова АН СССР, **6**, 19 (1952). ⁷ E. G. S. Varagon, Adv. Enzymol., **11**, 201 (1951). ⁸ R. Benesch, R. E. Benesch, Arch. Biochem., **19**, 35 (1948). ⁹ В. А. Энгельгардт, М. Н. Любимова, Биохимия, **7**, 205 (1942).