

WIESŁAW HOŁOBUT, ADAM KOŁATAJ

## ZACHOWANIE SIĘ GRUP SH GLUTATIONU PODCZAS PERFUZJI SERCA

Z Zakładu Fizjologii Człowieka A. M. w Lublinie  
Kierownik: prof. dr W. Hołobut

Liczne badania (*Slater, Smith, Sniger i Barron, Baldwin, Dixon i Webb, Neurath i Bailey, Thorn i Jackson*) nad grupami sulfhydryłowymi wykazały, że są one nieodzownymi czynnikami oddychania tkankowego, aktywatorami fermentów, regulatorami procesów przemiany materii, a zwłaszcza przemian białka (*Bertalanffy*). Blokada ich odpowiednimi substancjami doprowadza do inaktywacji niektórych enzymów, a aktywność ta może być ponownie przywrócona dopiero przez działanie związków zawierających swobodne wiązania SH, takich jak np. cysteiny czy zredukowanego glutationu.

*Kosztójanc i Turpajew* stwierdzili ponadto, że tkankowe grupy sulfhydrylowe mają duże znaczenie w procesach przenoszenia pobudzenia. Zaobserwowali oni, badając pracę serca, że przy związaniu grup sulfhydrylowych preparatami niektórych metali ciężkich, mięsień sercowy żaby stawał się nieczuły na impulsy z nerwu błędnego [14]. Efekt wpływu tego czynnika można było przywrócić po doprowadzeniu do mięśnia sercowego cysteiny. Autorzy ci, przeprowadzając również dalsze badania na mięśniach szkieletowych wysnuli wniosek, że grupy SH grają istotną rolę w skurczowym akcie mięśnia.

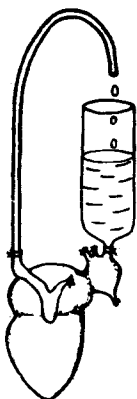
Ponieważ w myśl założeń *Kosztójanca*, do pracy mięśnia potrzebne są ugrupowania SH, postanowiono w niniejszych badaniach przekonać się jak zachowują się grupy sulfhydrylowe w związku z pracą serca, o ile znajdują się w jego środowisku. Postanowiono zbadać, czy serce podczas skurczów i rozkurczów wprowadza wiązania SH do przemywającego je płynu perfuzyjnego, czy też odwrotnie, pobiera je z perfuzatu.

### METODYKA

Badania prowadzono na izolowanym sercu żaby, poddając je najpierw perfuzji czystym płynem Ringera, a w dalszej części doświadczenia odpowiednim roztworem glutationu Merck. Darmstadt,  $10^{-5}$ — $10^{-3}$  M) w tym płynie. Badania prowadzono

w temperaturze pokojowej, a zmiany pH czystego płynu Ringera i płynu Ringera z glutationem wahały się od 7,15—7,20. Ogółem przeprowadzono dwadzieścia doświadczeń, w tym 66 obserwacji, a materiałem były żaby jesienne *Rana temporaria*.

W doświadczeniach naszych zastosowaliśmy metodę perfuzyjną o zamkniętym obwodzie, wg schematu przedstawionego na ryc. 1. W ten sposób niewielka, jedna i ta sama ilość płynu (2—3 ml) przez dowolnie długi czas krążyła przez serce, co miało zasadnicze znaczenie dla oznaczenia ilościowych zmian stężenia grup SH, zachodzących pod wpływem tak niedużego obiektu doświadczalnego jak serce żaby. Płyn wpływał do serca pod ciśnieniem słupa cieczy niedużego pojemnika zakończonego kaniulą wprowadzoną do zatoki żyłnej, wypływał zaś z serca w czasie skurczu komory, porcjami odpowiadającymi pojemnościom wyrzutowym, przez wąską kaniulę wprowadzoną do aorty, drugim zaś końcem skierowaną do pojemnika. Płyn perfuzyjny dawał się bardzo łatwo wymienić w ciągu doświadczenia, jak również łatwo pobrać do analizy. Ponadto zapisywano ruchy serca przy pomocy kardiografu połączzonego serfinką z koniuszkiem serca.



Ryc. 1. Schemat perfuzji serca żaby. Pojemnik wprowadzony jest do zatoki żyłnej, a kaniula wyprowadzająca do aorty.

Fig. 1. Frog heart perfusion diagrammatically. The vessel is connected to the sinus venosus and the outlet cannula to the aorta.

W celu wykrycia obecności wiązań SH, stosowano metodę kolorymetryczną wg Grunerta i Phillipsa [10]. Do 1 ml pobranego płynu perfuzyjnego dodawano 12 ml nasyconego roztworu NaCl i 2 ml 0,067 M nitroprusydku sodowego, stale świeżo przyrządzanego, po czym mierzono wartość ekstynkcji. Celem wywołania barwnej reakcji z ewentualnymi ugrupowaniami sulfhydrylowymi, dodawano już w kuwecie pomiarowej 2 ml 25% amoniaku [21] i ponownie badano ekstynkcję. Wynik odczytywano z krzywej standartowej. W drugim etapie obserwacji płynem perfuzyjnym był roztwór glutationu w płynie Ringera. Postępowanie analityczne dla określenia ewentualnej różnicy stężeń glutationu przed i po pracy serca było identyczne.

## WYNIKI

Wyniki analizy kolorymetrycznej zestawione są w tab. 1 i 2. Zestawiono tu obok siebie wartości koncentracji glutationu i odczyty galwanometru, a to celem lepszego ukazania wynikłych różnic. Tabela 1 przedstawia wyniki doświadczeń, w których przez serce żaby krążyła stale w okre-

sach 10, 20 lub 40 min. niewielka (2—3 ml), jedna i ta sama ilość czystego płynu Ringera. Jak wykazują wartości odczytów w perfuzatach tego rodzaju, grup sulfhydrylowych wykryć nie zdołano.

Wyniki natomiast drugiej części badań, dotyczące przemywania serca odpowiednimi roztworami glutationu w płynie Ringera i również płynem

Tabela 1. Wyniki z perfuzji serca żaby czystym płynem Ringera.

Table 1. Perfusion of a frog heart with pure Ringer's solution.

Nr dośw. 1)	Czas perfuzji w min. 2)	Odczyt ze skali fotokolorymetru 3)		Ilość SH w mg % glutat. 6)
		początkowy 4)	końcowy 5)	
1	10	17	16	—
	20	16	16	—
	40	16,5	16,5	—
2	10	21	21	—
	30	22	21	—
7	10	26	24	—
	20	27	26	—
8	10	30	28	—
	20	26	25	—
9	5	28	26	—
	10	27	25	—
12	10	26	25	—
	20	27	27	—
13	20	30	28	—
14	10	27	26	—

Experiment No. 1); Perfusion time in min. 2); Photocolorimeter readings 3); initial 4); ultimate 5); Number of SH groups in mg% of glutathione 6).

Ringera zestawiono w tab. 2. Tabela ta obejmuje tylko kilka doświadczeń, wybranych przykładowo z całości badań tej serii, których wyniki są zgodne z pozostałymi.

Analizując wyniki uzyskane po przemywaniu serca roztworami różnych stężeń glutationu w płynie Ringera widzimy, że zawsze podczas pracy serca glutationu ubywało, stężenie bowiem tej substancji w płynie perfuzyjnym po pracy serca było zawsze niższe od wyjściowego. W jednym tylko wypadku (dośw. 15) pojawiła się w czystym płynie Ringera nieznaczna ilość grup sulfhydrylowych (0,45 mg<sup>o</sup>/o), co można wytłumaczyć

Tabela 2. Wyniki perfuzji serca roztworami glutationu w płynie Ringera i roztworami czystego płynu Ringera.

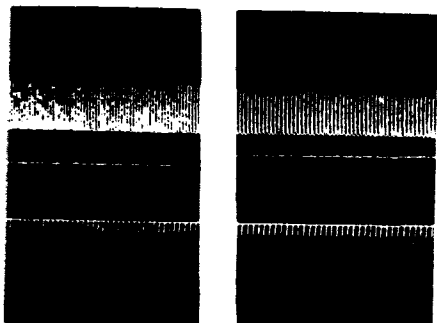
Table 2. Perfusion of heart with glutathione in Ringer's solution and pure Ringer's solution

Nr dośw. 1)	Czas perfuzji w min. 2)	Płyn perfuzyjny 3)	Odczyt na skali fotokolorymetru 4)		mg% SH-glut. 7)	Różnica w % wartości SH-glut. w st. do początk. 8)
			początk. 5)	końcowy 6)		
2	20	Ringer	28	28	—	—
		Glutation	26	39	6,43	
	10	Glutation	26	30	1,89	71,6
	5	Ringer	24	22	—	—
4	5	Ringer	26,5	25	—	—
	20	Ringer	25	23	—	—
		Glutation	26	80	43,06	
	5	Glutation	28	67	25,58	40,6
10	5	Ringer	24	21	—	—
	10	Ringer	29	22	—	—
		Glutation	28	62	20,96	
	10	Glutation	28	58	17,71	15,6
15	15	Ringer	29	27	—	—
		Glutation	29	90	64,40	
	10	Glutation	30	88	57,89	10,2
	5	Ringer	24	24	—	—
	5	Glutation	56	82	29,36	54,6
	10	Ringer	28	29	0,45	
	10	Ringer	29	28	—	—
16	10	Ringer	25	24	—	—
		Glutation	27	33	2,80	
	5	Glutation	26	28	0,98	65,0
	5	Ringer	27	25	—	—
	5	Glutation	25	27	0,91	67,5
17	5	Ringer	29	28	—	—
	10	Ringer	27	25	—	—
		Glutation	26	32	2,87	
	5	Glutation	24	23	!!	100,0
	7	Ringer	27	26	—	—
	5	Glutation	28	30	0,83	71,1

Experiment No. 1); Perfusion time in min. 2); Perfusate 3); Photocolorimeter readings 4); Initial 5); Ultimate 6); mg% of glutathione's SH 7); Difference, in % of initial glutathione-SH value 8).

niezakończonym jeszcze wymywaniem glutationu po uprzedniej perfuzji stosunkowo dość silnymi jego roztworami.

Widoczne jest także, że gdy w perfuzacji dawano niskie stężenia glutationu to serce pobierało większy procent tej substancji z roztworu, np. w dośw. 2. — 71,6%, w dośw. 16. — 65,0% i 67,5% i w dośw. 17. — 71,1%. Odwrotnie natomiast, im koncentracja była wyższa tym obserwowano się mniejszy procent ubytku jak np. w dośw. 4. — 40,6%, w dośw. 15. — 10,2%.



Ryc. 2. a) Perfuzja płynem Ringera, b) perfuzja  $10^{-4}$ . 5 m roztworem glutationu w płynie Ringera. (Widoczne jest nieznaczne obniżenie amplitudy i częstości akcji serca).

Fig. 2. a) Perfusion with Ringer's solution; b) perfusion with Ringer's solution; c) perfusion with  $10^{-4}$ . 5 molar glutathione in Ringer's solution. (A slight reduction in the heart action amplitude and frequency may be noted).

Obserwując tę część doświadczenia można ogólnie stwierdzić, że podczas pracy serca, poziom glutationu w płynie perfuzyjnym obniża się w stosunku do pierwotnego i to we wszystkich badanych przypadkach. Ilość mg% glutationu jest początkowo zawsze prawie wyższa niż po kilku-minutowej pracy serca.

We wszystkich naszych doświadczeniach przejście z perfuzji płynem Ringera na roztwór glutationu w granicach stężeń używanych powodowało nieznaczne zmniejszenie amplitudy i częstości skurczów serca, jak to widać z załączonej przykładowo ryc. 2.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Na podstawie przedstawionych badań wydaje się, że mięsień sercowy podczas swej pracy, w mniejszym lub większym stopniu pobiera ze środowiska ugrupowania SH. Obserwacje te potwierdzają uwagi Kosztójanca i Turpajewa, sugerujące, że do skurczu mięśnia potrzebne są m. in. wiązania sulfhydrylowe. Także Neurath i Bailey przekonani są, że wiązania SH odgrywają dużą rolę w pracy mięśnia i, że w miarę tej pracy ilość ich zmienia się. Turpajew badając izolowane serce żaby stwierdził wyraźnie, że dodatek grup sulfhydrylowych do płynu perfuzyjnego serca, zatrutego solami ciężkich metali, przyczyniał się do podjęcia ponownej pracy przez mięsień sercowy i stanowił jakby odtrutkę dla tych inhibitorów.

Biochemiczne badania nad udziałem glutationu w pracy serca prowadził Slater. Porównywał on inhibicyjną akcję różnych związków chemicznych wiążących grupy SH glutationu w preparacie mięśnia sercowego i stwierdził, że szkodliwe działanie ich polega na łączeniu się z aktywnymi grupami SH w cząsteczce glutationu lub cząsteczce dehydrogenazy bursztynowej. Także Smith, badając niektóre enzymy mięśnia sercowego, stwierdził, iż dodatek cysteiny wybitnie hamuje działanie enzymu rozkładającego połączenia między poszczególnymi aminokwasami, m. in. wchodzącymi w skład glutationu. Binet, Wellers i Marquis obserwowali zmienność glutationu m. in. w mięśniu sercowym szczura pod wpływem alloksanu i stwierdzili zmniejszenie się ogólnej jego ilości po iniekcji wymienionego preparatu.

Podobne do naszych doświadczeń przeprowadzili Granier-Doyeux i współprac., poddając izolowane serce żaby działaniu roztworu hydrochlorku cysteiny. Widoczny był efekt inotropowy i tonotropowy negatywny, działanie to było jednak przemijające.

Dalsze studia Kosztojanca [12] i Kosztojanca z Turpajewem [47] pozwalają przypuszczać, że białka zawierające tak charakterystyczne wiązania jak wiązania tiolowe, stanowią pewne elementy strukturalne mięśnia, zwłaszcza miozynu. Wiązania te biorą udział w mechanizmie pobudzania mięśnia, w tym także serca i w przenoszeniu pobudzenia. Kosztojanec stwierdził ponadto, że zdolność do pracy zmęczonego częstym drażnieniem mięśnia szkieletowego wzrasta dość ostro przy działaniu cysteiny lub mocznika. Także, wcześniej jeszcze, Mirsky wykazał, że aktynomiozyn mięśnia zawiera aktywne grupy SH, a Sniger i Barron studiowali systematycznie zależność aktywności AT Pazy (adenozynotrójfosfatazy) miozynu od czynników utleniających grupy SH. Objawy inhibicyjne skorelowane tu były z zanikiem tych grup. Przypuszczenia, że od obecności tych grup może zależeć enzymatyczna aktywność miozynu i zdolność tworzenia się aktinomiozynu, wysuwają także Bailey, Bárány i Bárány, Brahms oraz Brahms i Kąkol [7].

Wszystkie przytoczone wyżej badania wskazują, że obecność tkankowych grup sulfhydrylowych ma duże znaczenie dla przebiegu licznych fizjologicznych procesów w mięśniu, a w szczególności dla normalnego przebiegu skurczu mięśnia, w tym także i mięśnia sercowego. Obserwacje nasze zdają się potwierdzać wnioski cytowanych autorów. W doświadczeniu okazało się bowiem, że serce pobiera podczas swej pracy grupy SH z otoczenia — przy przemywaniu go płynem perfuzyjnym, grupy tiolowe wprowadzone do roztworu znikają. Można zaobserwować, że ubytek ten był wyższy w przypadku roztworów bardziej rozcieńczonych, niż przy wyższych stężeniach. Wydaje się z tego, jakoby serce dla swoich procesów życiowych wymagało ściśle określonej ilości grup sulfhydrylowych, które

adekwatnie pobiera z perfuzatów bardziej lub mniej stężonych. Spostrzeżenia te nasuwają wniosek, że mięsień sercowy potrzebuje do wykonywania swej pracy ugrupowań tiolowych z zewnątrz. W warunkach normalnych dostarczane są one przez krew. W mięśniu sercowym zachodzi prawdopodobnie ciągła asymilacja i dyssymilacja tych połączeń, a rola ich nie ogranicza się zapewne tylko do wpływu na kurczliwość miozynu czy do zapewnienia koniecznej struktury chemicznej tego białka, ale także do aktywacji całego szeregu enzymów, uruchamiających biochemiczny mechanizm skurczu.

Nie udało się w naszych badaniach znaleźć natomiast, by pracujący mięsień sercowy wprowadzał ugrupowania SH do roztworu perfuzyjnego. Analiza perfuzatów nie zdołała wykryć tam obecności wiązań tiolowych.

Doświadczenie nasze wykazało także, że po wprowadzeniu do perfuzatu glutationu, akcja serca zmieniała się nieco. Powstawało nieznaczne zmniejszenie amplitudy i częstości skurczów. Te nieznaczne negatywne efekty chrono- i inotropowe potwierdzają wcześniejsze spostrzeżenia *Granier-Doyeux* i współautorów. Można przypuszczać, że jest to spowodowane prawdopodobnie niewielkim zwiększeniem się ciśnienia osmotycznego roztworu, na skutek wprowadzenia pewnej ilości dość dużych cząsteczek trójpeptydu jakim jest glutation.

#### WNIOSKI

1. W czasie pracy izolowanego serca żaby nie stwierdzono pojawiania się grup SH w czystym płynie Ringera, natomiast przy perfuzji płynem Ringera o różnych koncentracjach glutationu zaobserwowano ich ubytek.
2. Wydaje się, że izolowane serce pobiera ugrupowania SH z zewnątrz.
3. Perfuzja roztworami glutationu nieznacznie zmniejsza amplitudę i częstość skurczu.

*В. Голобут, А. Колонтай*

#### ГРУППЫ SH ГЛЮТАТИОНА ВО ВРЕМЯ ПЕРФУЗИИ СЕРДЦА

##### *Содержание*

Исследовалось поведение групп SH глютациона в связи с работой изолированного сердца лягушки при перфузии с замкнутым кровообращением. На основании колориметрического анализа установлено, что во время работы сердца, при промывании соответствующими растворами глютациона в растворе Рингера концентрация групп SH глютациона снижалась. Не замечено, чтобы изолированное сердце

лягушки, промываемое только чистом раствором Рингера, вводило в раствор группы SH. Кажется, что изолированное сердце воспринимает группы SH иначе.

Перфузия растворами глутатиона незначительно уменьшает амплитуду и частоту сокращений.

W. Hołobut, A. Kołataj

## THE BEHAVIOUR OF GLUTATHIONE'S SH GROUPS DURING HEART PERFUSION

### Summary

The investigations concerned the behaviour of glutathione's SH groups in connection with the work of a frog's isolated heart during closed-circuit perfusion. Colorimetry showed concentration of SH groups to diminish in Ringer's solution during perfusion of the working heart with suitable glutathione solutions. When the heart was perfused with pure Ringer's solution only, it appeared to give off into the solution no SH groups. An isolated heart seems to derive SH groups from without.

Perfusion with glutathione solution slightly diminished systolic amplitude and cardiac frequency.

### PIŚMIENNICTWO

1. *Bailey K.*: Structure Proteins. II. Muscle; w „The Proteins, Chemistry, Biological Activity and Methodes”, *Neurath H., Bailey K.*, Academic Press Inc. Publishers, New York, 1953, II B.
2. *Baldwin E.*: *Biochemia dynamiczna*, PWRiL, Warszawa, 1959.
3. *Bárány M., Bárány K.*: *Bioch. Bioph. Acta*, 1959, 35, 293.
4. *Bertalanffy L.*: *Theoretische Biologie*, A. Franckie AG, Bern, 1951, II.
5. *Binet L., Wellers G., Marquis M.*: *Compt. Rend. de l'Acad. des Sci.*, 1949, 23, 229. *Cyt. wg Excerpta Medica*, Sec. II, III, part II, 1950, 4536.
6. *Brahms J.*: *Postępy Biochemii*, 1959, 5, 439.
7. *Brahms J., Kąkol J.*: *Acta Physiol. Pol.*, 1957, 8, 282.
8. *Dixon M., Webb C.*: *Enzymes*, Longmans Green and Co, London, New York, Toronto, 1958.
9. *Granier-Doyeux M., Sanabria A., Holz S.*: *Produits Pharmaceut.*, 1949, 4/6, 225. *Cyt. wg Excerpta Medica*, Sec. II, III, part III, 1950, 1512.
10. *Grunert R., Phillips P.*: *Archiv of Biochem.*, 1951, 30, 284.
11. *Hughs W.*: *Interstitial Proteins, The Proteins of Blood Plasma and Lymph*; w „The Proteins, Chemistry, Biological Activity and Methodes”, *Neurath H., Bailey K.*, Academic Press Inc. Publishers, New York, 1953, II B.
12. *Kosztójanc Ch. S.*: *Dokł. Ak. Nauk SSSR*, 1950, 72, 981.
13. *Kosztójanc Ch. S.*: *Chimizm obmiena wieszczestw, struktura białkowych tiei i nerwnaja regulacja*, Inst. Bioch. Ak. Nauk Ukr. SSR, Moskwa, 1954.
14. *Kosztójanc Ch. S., Turpajew T. M.*: *Compt. Rend. (Doklady) de l'Acad. des Sci. de l'URSS*, 1946, 54, 181.
15. *Mirsky A. E.*: *J. Gen. Physiol.*, 1936, 19, 559.



16. *Neurath H., Bailey K.*: The Proteins, Chemistry, Biological Activity and Methods, Academic Press Inc. Publishers, New York, 1953, I A.
17. *Slater E. C.*: Biochem. J., 1949, 45/2, 130.
18. *Smith E. L.*: J. Biol. Chem., 1948, 173/2, 571.
19. *Sniger T. P., Barron E. S.*: Proc. Exper. Biol. Med., 1944, 56, 120.
20. *Thorn M. B., Jackson F. L.*: Bioch. Bioph. Acta, 1959, 35, 65.
21. *Turpajew T. M.*: Biochimia, 1951, 6/16, 611.

Otrzymano: 3. 5. 1960.

Adres autorów: Lublin, Zakład Fizjologii Człowieka A. M., ul. Lubartowska 85.