

WIESŁAW HOŁOBUT, ADAM KOŁATAJ

POLAROGRAFICZNE OZNACZANIE CYSTEINY W PERFUZJI SERCA ŻABY

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

Znaczenie grup sulfhydrylowych w aktywacji wielu procesów enzymatycznych związanych z przemianą materii ujawniły liczne badania lat ostatnich [1, 2, 3, 5, 20], przy czym od dawna znana ich rola w procesach oksydo-redukcyjnych tkanek jest wciąż aktualnym zagadnieniem [8, 22, 24]. Badania *Kosztocjanca* [13, 14, 15, 16] i współpracowników [17, 18, 21, 25] wykazały, że ugrupowania te są również istotnymi czynnikami w chemicznym procesie przenoszenia impulsów z tkanki nerwowej na mięśnie. Doświadczenia z perfuzją serca żaby pozwoliły ustalić, że przy zablokowaniu grup SH odpowiednimi czynnikami, serce nie reagowało na impulsy z drażnionych nerwów błędnych i acetylocholinę, a normalne efekty można było przywrócić dopiero po wprowadzeniu takich związków jak cysteina czy glutation.

Poprzednie badania nasze pokazały [11], że stosując perfuzję izolowanego serca żaby płynem Ringera zawierającym glutation, obserwuje się ubytek grup sulfhydrylowych podczas pracy serca. Doświadczenia te dowiodły aktywnego wykorzystywania grup SH przez rytmicznie pracujące serce, przy przemywaniu go płynem odżywczym glutationu. Obecnie wydaje się nam interesującym zbadać czy podobne stosunki, mówiące o zachowaniu się serca wobec grup SH, odnoszą się również i do cysteiny, która w porównaniu z glutationem ma cząsteczkę mniejszą i prawdopodobnie szybciej dyfundująca.

METODYKA

Badania przeprowadzono na izolowanym sercu żaby *Rana temporaria* przy pomocy perfuzji o zamkniętym obiegu. Jedna i ta sama ilość płynu (2—3 ml) mogła przez dowolnie długi czas krążyć przez serce i dawała się zarówno łatwo wymieniać jak i pobierać do analizy. Ruchy serca zapisywano przy pomocy kardiografu.

Ogółem przeprowadzono 12 doświadczeń, w tym 42 oznaczenia. Izolowane serce poddawano najpierw perfuzji czystym płynem Ringera, a potem odpowiednimi roztworami cysteiny (Schuchart NRF) w tym płynie ($8,3 \cdot 10^{-3}$ — $33,0 \cdot 10^{-3}$ M). Badania prowadzono w temp. pokojowej, a zmiany pH wahały się od 6,95—7,15.

W celu wykrycia obecności wiązań SH w analizowanych roztworach zastosowano metodę polarograficzną [4, 10, 26, 27]. Do 10 ml buforu kobaltowego (50% 0,001 M CoCl_2 + 25% 1 M NH_4Cl + 25 % 1 M NH_3) dodawano 0,1 ml badanego płynu, pobranego z przemywającego serce perfuzatu i polarografowano przy czułości 1/300, od — 0,8 v, 20—25 kropel/1 min. Po wywołaniu polarogramu porównywano otrzymaną falę z falą czystego buforu i falą wstępnych, użytych w perfuzacji rozcieńczeń cysteiny. Wysokość fali mierzono w mm.

WYNIKI

Wyniki analizy polarograficznej zestawione są w tab. 1. Stopień koncentracji cysteiny w płynie Ringera mierzono wysokością fali. Z tabeli widać, że przy przemywaniu serca czystym płynem Ringera nie udało się wykazać w ogóle pojawienia się fali cysteiny i to we wszystkich badanych przypadkach. Natomiast, gdy serce poddano perfuzji roztworem cysteiny w płynie Ringera o wyznaczonej uprzednio wysokości fali, obserwowano obniżenie się fali np. w doświadczeniu 1 z 73,5 mm do 63 mm, w dośw. 4 z 42 mm do 35,5 i 26,5 mm itd. Podobne obniżki zanotowano także we wszystkich przypadkach.

Wydaje się, że w niektórych doświadczeniach występuje pewna regularność w obniżaniu się fali, a więc i w procentach ubytku cysteiny. W dośw. 5, 9, a także 10 i 11 widać, że przy pierwszych przemywaniach serca, fala obniża się najbardziej w stosunku do początkowej wartości, przy następnych zaś obniżki te są już stopniowo mniejsze. Świadczyłoby to o pewnej regularności ubywania grup SH cysteiny z perfuzatu serca.

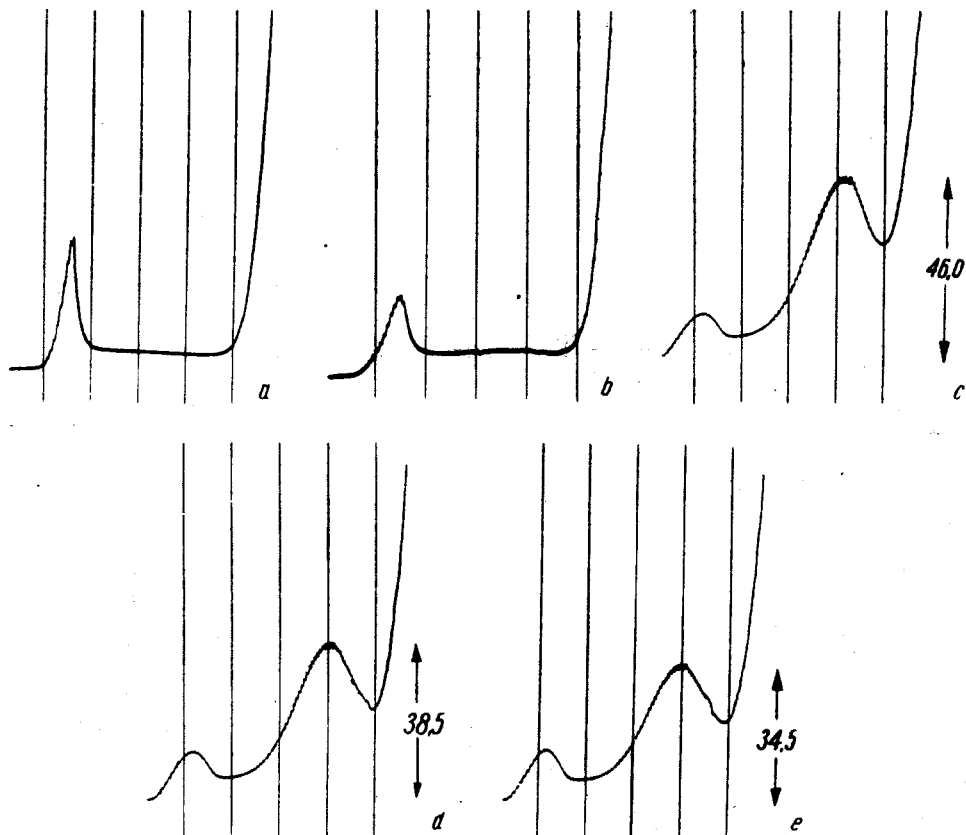
Na ryc. 1 c, d, e, widać zmniejszanie się wysokości fali od wyjściowego roztworu cysteiny, gdzie jest ona najwyższa i ma 46,0 mm. Przemycie serca tym roztworem cysteiny obniżało stale wysokość fali do 34,5 i 38,5 mm.

Analizując całość wyników można stwierdzić, że zawsze podczas pracy serca cysteiny ubywało z perfuzatu, stężenie jej bowiem w płynie perfuzyjnym po pracy serca było zawsze niższe od wyjściowego. Potwierdzają to wymiary odpowiednich fal polarogramów.

Zaobserwowano ponadto w doświadczeniach naszych, że przejście z perfuzji płynem Ringera na roztwór cysteiny powodowało nieznaczne zmniejszenie się amplitudy i częstości skurczów serca. Widać to z załączonej przykładowo ryc. 2, dotyczącej dwóch doświadczeń.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze spostrzeżenia autorów [11] poczynione nad perfuzją serca z glutationem. Podobnie jak tam, tak i tu okazało się, iż serce podczas swej rytmicznej pracy pobiera z otoczenia



Ryc. 1. Polarogramy z doświadczenia Nr 9 z dn. 2. 4. 1960. a) fala kontrolna buforu kobaltowego; b) fala roztworu po przemyciu serca czystym płynem Ring.; c) fala wyjściowego roztworu cysteiny w płynie Ring., przed przemyciem serca; d) i e) fale roztworu po perfuzji przez serce.

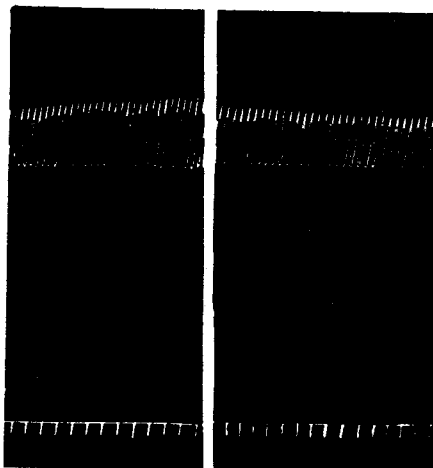
Fig. 1. Polarogram from experiment No. 9, April 2, 1960. a) Control wave of the cobalt buffer; b) wave of the solution after perfusion of the heart with pure Ringer's solution; c) wave of the starting solution of cysteine in Ringer's solution, before perfusion of the heart; d) and e) waves of the solution after perfusion through the heart.

ugrupowania tiolowe. Przed rozpoczęciem perfuzji serca fala cysteinowa była we wszystkich prawie doświadczeniach wyższa niż po perfuzji. Natomiast nie udało się, również na drodze polarograficznej, stwierdzić by pracujące serce wprowadzało do perfuzatu własne grupy SH. Po przemy-

ciu bowiem serca czystym płynem Ringera nie można było ujawnić w tym płynie obecności grup sulfhydrylowych.

Na podstawie tych obserwacji wydaje się, iż pracujący mięsień sercowy pobiera wiązania SH cysteiny z zewnątrz, o ile znajdują się one w jego środowisku.

O udziale tych wiązań w skurczu mięśnia wspomina wielu badaczy [2, 3, 15, 16]. Łogunowa i Kiperszlak badali także znaczenie grup sulfhydrylowych dla normalnej bioelektrycznej aktywności serca, uzyskując ciekawe wyniki na elektrokardiogramach. Jakowlew i Sokołowski analizowali nawet znaczenie lokalizacji czynnych, funkcjonalnych grup SH w komorze



Ryc. 2. Dośw. nr 5 z dnia 22. 3. 1960; a) perfuzja serca płynem Ringera, b) perfuzja serca roztworem cysteiny w płynie Ringera.

Fig. 2. Experiment no 5 of 22. 3. 1960; a) perfusion of the heart with Ringer's fluid, b) perfusion of the heart with cystein solution in Ringer's fluid.

serca żaby, a Torczyński badał udział ich w przewodnictwie nerwowym w związku z intensywnością przemian chemicznych. Obserwacje nasze potwierdzają niektóre ze spostrzeżeń tych autorów, zwłaszcza Kosztojanca [13—16] i współpracowników [17, 18, 21, 25]. Ponadto, badania nasze oparte o metodę polarograficzną pozwoliły wykryć pewne zależności ilościowe między grupami SH środowiska a pracującym sercem. Na podstawie charakterystyki fal polarograficznych wydaje się, iż serce pobiera pewną adekwatną ilość grup SH, zwykle bowiem, przy pierwszym przemywaniu ubywało w perfuzacji więcej cysteiny niż przy następnych. Przy jednoczesnym braku wprowadzania grup SH do płynu Ringera przemywającego serce, nasuwa to wniosek, że mięsień sercowy potrzebuje do wykonywania swej pracy ugrupowań tiolowych z zewnątrz.

Tabela 1. Wyniki analizy polarograficznej perfuzatów serca żaby roztworami cysteiny w płynie Ringera i czystym płynem Ringera.

Table 1. Polarographic analysis of perfusates of a frog heart after perfusion with Ringer's solution with and without cysteine.

Nr dośw. 1)	Czas perfuzji w min. 2)	Płyn perfuzyny 3)	Wys. fali w mm 4)	Procent ubytku cysteiny 5)
1	20	Ringer	—	—
	10	Cysteina *	73,5	—
		Cysteina	63,0	14,3
2	5	Ringer	—	—
	5	Cysteina *	73,5	—
		Cysteina	65,0	11,6
3	10	Ringer	—	—
4	10	Ringer	—	—
		Cysteina *	42,0	—
	5	Cysteina	35,5	15,6
	5	Ringer	—	—
	5	Cisteina	26,5	36,6
5	15	Ringer	—	—
		Cysteina *	38,5	—
	5	Cysteina	33,0	14,4
	3	Ringer	—	—
	3	Cysteina	34,0	12,0
	3	Ringer	—	—
	3	Cysteina	39,0	!
6	10	Ringer	—	—
		Cysteina *	46,0	—
	5	Cysteina	34,5	25,0
	5	Ringer	—	—
	5	Cysteina	34,0	26,0
7	5	Ringer	—	—
		Cysteina *	46,0	—
	5	Cysteina	30,0	34,8
	5	Ringer	—	—
	5	Cysteina	25,5	44,4
8	5	Ringer	—	—
	5	Ringer	—	—
9	5	Ringer	—	—
		Cysteina *	46,0	—
	5	Cysteina	32,0	30,4

Tab. 1. Ciąg dalszy.

Nr dośw. 1)	Czas perfuzji w min. 2)	Płyn perfuzyjny 3)	Wys. fali w mm 4)	Procent ubytku cysteiny 6)
9	5	Ringer	—	25,0
	5	Cysteina	34,5	
	5	Ringer	—	
	5	Cysteina	38,5	
10	5	Ringer	—	70,0
	5	Cysteina *	50,0	
	5	Cysteina	15,0	
11	10	Cysteina	26,5	47,0
	5	Ringer	—	42,4
	5	Cysteina *	39,0	
5	Cysteina	22,5		
12	5	Cysteina	37,5	4,0
	5	Ringer	—	12,7
	5	Cysteina *	83,0	
5	Cysteina	72,5		
		Ringer	—	

Cysteina * — wartość stężenia początkowego w płynie Ringera, którym przemywano serce. Experiment No. 1); Perfusion time, in min. 2); Perfusate 3); Wave heigh, in mm. 4); Percentual decrement of cysteine 5); — Cysteine* — initial concentration in the Ringer's solution used to perfuse the heart.

W badaniach naszych okazało się ponadto, że perfuzja serca roztworami cysteiny nieznacznie zmniejszyła amplitudę i częstość skurczu. Podobne reakcje zaobserwował wcześniej *Gravier-Doyeux* i współautorzy.

WNIOSKI

1. Posługując się metodą polarograficzną, nie stwierdzono, by izolowane serce żaby w czasie swej pracy wprowadzało do roztworu własne ugrupowania sulfhydrylowe. Zaobserwowano natomiast przy perfuzji roztworami cysteiny w płynie Ringera, iż poziom cysteiny zmniejsza się po pracy serca w stosunku do wyjściowego.

2. Wydaje się, że izolowane serce żaby pobiera ugrupowania SH z zewnątrz.

3. Perfuzja roztworami cysteiny nieznacznie zmniejsza amplitudę i częstość akcji serca.

В. Голобут, А. Колонтай

ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ ЦИСТЕИНА В ПЕРФУЗИИ СЕРДЦА ЛЯГУШКИ

Содержание

При помощи полярографического метода исследовалось поведение SH цистеина во время перфузии сердца лягушки. Не установлено, чтобы сердце во время своей работы вводило в раствор собственные сульфгидрильные группы. Зато замечено при перфузии сердца растворами цистеина в растворе Рингера, что по сравнению с исходным уровень цистеина снижается. Можно предполагать, что изолированное сердце лягушки заимствует группы SH извне.

Перфузия растворами цистеина только незначительно уменьшает амплитуду и частоту деятельности сердца.

W. Hołobut, A. Kołataj

POLAROGRAPHIC DETERMINATION OF CYSTEINE DURING PERFUSION OF A FROG HEART

Summary

The behaviour of cysteine SH groups was surveyed polarographically during perfusion of a frog heart. No evidence was found that the heart releases during work own SH groups into the solution. However, during perfusion with cysteine dissolved in Ringer's solution, the level of that amino acid was noted to decrease in the perfusate. The isolated frog heart may be supposed to take up SH groups from without.

Perfusion with cysteine solutions slightly diminishes function the amplitude and rate of the heart.

PIŚMIENICTWO

1. *Balachowskij D. S., Drozdowa N. N.*: Uspiechy Sowr. Bioł., 1956, 42, 121.
2. *Bárány M., Bárány K.*: Biochim. Bioph. Acta, 1959, 35, 293.
3. *Brahms J.*: Postępy Biochemii, 1959, 5, 439.
4. *Brdička R.*: Nature, 1937, 139, 330.
5. *Cooperstein S. J., Lazarow A.*: J. Biol. Chem., 1958, 232, 695.
6. *Deborin G. A., Elpinier J. E., Szibanowa O. M.*: Doklady AN SSSR, 1955, 101, 309.
7. *Goffart M.*: J. Physiol., 1954, 126, 16 P.
8. *Goldstein B. J.*: Uspiechy Sowr. Bioł., 1954, 38, 280.
9. *Granier-Doyeux M., Sanabria A., Holz S.*: Prod. Pharmac., 1949, 4/6, 225; cyt. wg Excerpta Medica, Sec. II, III, p. III, 1950, 15.
10. *Heyrovsky J., Zuman P.*: Wstęp do polarografii praktycznej, PWN, Warszawa, 1956.
11. *Hołobut W., Kołataj A.*: Acta Physiol. Polon. 1961, 12, 63.
12. *Jakowlew W. A., Sokolowskij W. W.*: Doklady AN SSSR, 1955, 101, 321.
13. *Kosztójanc Ch. S.*: Fizjoł. Zurn. SSSR, 1950, 36, 92.
14. *Kosztójanc Ch. S.*: Doklady AN SSSR, 1950, 72, 981.

15. *Kosztójanc Ch. S.*: Dokłady AN SSSR, 1953, 88, 369.
16. *Kosztójanc Ch. S.*: Chimizm obmiena wieszczestw, struktura białkowych tiel i nerwnaja regulacja, Moskwa, Inst. Bioch. AN Ukr. SSR, 1954.
17. *Kosztójanc Ch. S., Turpajew T. M.*: Dokłady AN SSSR, 1946, 54, 181.
18. *Kosztójanc Ch. S., Turpajew T. M.*: Comptes Rend. (Dokłady) de l'Academie des Sciences de l'URSS, 1946, 54, 181.
19. *Logunowa K. S., Kiperszlak C. Z.*: Fizjoł. Żurn. SSSR, 1953, 39, 71.
20. *Mills G. G., Harvey R. P.*: J. Biol. Chem., 1958, 232, 499.
21. *Ńistratowa S. N., Turpajew T. M.*: Biochimia, 1959, 24, 171.
22. *Rodionow W. M., Kedrowa E. M., Marczenko G. I.*: Biochimia, 1959, 24, 539.
23. *Sławiński P.*: Kosmos A, PWN, Warszawa, 1960, 1/42, 18.
24. *Torczyński J. M.*: Biochimia, 1959, 24, 496.
25. *Turpajew T. M.*: Biochimia, 1951, 16, 611.
26. *Witwicka J.*: Postępy Biochemii, 1955, 1, 85.
27. *Witwicki J.*: Postępy Biochemii, 1955, 1, 63.
28. *Witwicki J., Żyło J.*: Postępy Biochemii, 1955, 1, 113.

Otrzymano: 30. 5. 1960.

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