

Н. Л. ФЕЛЬДМАН

## ВЛИЯНИЕ ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКОВ НА КОАЦЕРВАЦИЮ ИХ С КРАСИТЕЛЯМИ

(Представлено академиком Н. Н. Аничковым 1 IX 1950)

Некоторые основные прижизненные красители откладываются в протоплазме неповрежденных клеток в виде гранул. При повреждении, даже обратимом, способность клетки к гранулообразованию подавляется. Д. Н. Насонов и В. Я. Александров<sup>(1,2)</sup> показали, что вследствие этого прижизненное окрашивание гранулообразующими красителями может быть использовано для суждения о функциональном состоянии клеток и тканей. Поэтому представляет интерес исследование механизма гранулярного накопления красителей в клетке. Тем более, что сходно с красителями откладываются вещества, нормально встречающиеся в организме.

Ранее было показано, что гранулы красителя возникают в результате взаимодействия его с каким-то протоплазматическим белком<sup>(3-5)</sup>. Нам удалось установить, что в основе этого процесса лежит комплексная коацервация красителя с белком<sup>(6)</sup>. Однако при этом перед нами встал следующий вопрос: если гранулы возникают благодаря коллоидно-химической реакции коацервации, чем объясняется тот факт, что они образуются лишь в нормально функционирующей клетке и после повреждения гранулообразование становится невозможным? Согласно денатурационной теории Насонова и Александрова, при воздействии различных алтерерирующих агентов на клетку в протоплазме происходит ряд сдвигов, причиной которых является денатурация клеточных белков. Возникает мысль, не является ли нативное состояние протоплазматического белка, которое поддерживается активной жизнедеятельностью клетки, необходимым условием для коацервации. Если это так, то прекращение гранулообразования при повреждении можно было бы рассматривать как результат денатурационных изменений, делающих невозможной реакцию коацервации. В таком случае прекращение гранулообразования могло бы служить таким же показателем денатурации клеточных белков, каким до сих пор является увеличение сорбционных свойств<sup>(1,7)</sup>. Для изучения этого вопроса мы занялись исследованием влияния денатурации белков на их коацервационную способность.

Исследование проводилось на сыворотке крови лягушки и лошади и на сывороточном и яичном альбумине. В последних двух случаях опыты проводились в фосфатном буфере и в буфере Мак-Ильвена в интервале рН 6,5—8. Концентрация белка была 0,1%. Из красителей употреблялись, главным образом, сернокислый нильский голубой 0,1% и иногда нейтральный красный 0,1%. Коацервацию получали, осторожно соединяя стеклянной палочкой капли белка и красителя, помещенные на предметном стекле<sup>(6)</sup>. Из факторов, вызывающих денатурирующие воздействия, нами были изучены: ацетон, температура, ультрафиолетовые лучи и мочевины.

Ацетон вызывает в белке в первую очередь коллоидные изменения. На холоду коагуляция, вызываемая ацетоном, легко обратима<sup>(1)</sup>. При комнатной температуре коагуляция становится необратимой, так как, кроме того, происходят молекулярные изменения белка. Мы воспользовались этими свойствами ацетона, чтобы выяснить, как влияет изменение коллоидного состояния белка на способность к коацервации.

Опыты ставились следующим образом: при комнатной температуре к 1 мл 1% яичного альбумина добавлялось 0,3 мл ацетона. Таким образом, концентрация ацетона равнялась 23%. Под влиянием ацетона белок выпадал в осадок, при взаимодействии с красителем коацервация не происходила. Через 30 мин. к этой смеси добавлялось 3,7 мл воды, следовательно, концентрация ацетона снижалась до 6%. Несмотря на это, осадок белка не растворялся и способность к коацервации не восстанавливалась. Можно было предположить, что само по себе присутствие ацетона, даже в концентрации 6%, препятствует коацервации. Поэтому мы провели контрольную серию опытов при 0°. Так же как и при комнатной температуре при 0°, в присутствии 23% ацетона белок выпадал в осадок и оказывался неспособным к коацервации. Но если при этом через 30 мин. концентрация ацетона доводилась прибавлением воды до 6%, осадок почти полностью растворялся, и во вновь полученном растворе нативного белка восстанавливалась способность к коацервации. Следовательно, ацетон сам по себе не препятствует коацервации. Но вызываемые им в белке коллоидные изменения делают коацервацию невозможной.

**Температура.** Раствор белка нагревался 10 мин. при различной температуре на водяной бане. После охлаждения исследовалась его коацервационная способность. Контролем служил ненагревавшийся белок. В контроле после соединения капель белка и красителя немедленно начинается коацервация. В опыте, т. е. после нагревания белка, капли коацервата не образуются. Вместо этого при смешивании с красителем окрашиваются крупные и мелкие хлопья коагулированного белка. Результаты таких опытов представлены в табл. 1. Сыворотка крови лягушки теряет способность к коацервации после 10 мин. нагревания при 55°. Лошадиная сыворотка перестает коацервировать после нагревания при 65°. Однако характер коацервации изменяется уже после воздействия температурой 60°. Наряду с нормальными каплями коацервата в большом количестве встречаются хлопья, а также сетевидные образования, имеющие многочисленные каплевидные вздутия. Они возникают, повидимому, в результате слияния и вытягивания отдельных капелек коацервата.

Коагуляцию белка, денатурированного теплом, можно рассматривать как следствие его молекулярных изменений. Из самого определения коацервации следует, что коагулированный белок не может коацервировать. Поэтому результаты, полученные нами в опытах с воздействием ацетона на яичный альбумин и нагревания на сыворотки, не являются неожиданными. При определенных условиях, как известно, можно получить денатурационные изменения молекул без последующих коллоидных превращений белка. В связи с этим возникает вопрос, способен ли к коацервации денатурированный белок, не находящийся в коагулированном состоянии. Нами был поставлен ряд опытов в условиях, исключающих коллоидные превращения в белке, а именно, с нагреванием при значениях pH, достаточно удаленных от изоэлектрической точки. В этих опытах были использованы сывороточный и яичный альбумины.

Сывороточный альбумин при pH 6,5 и 7,0 после нагревания при 70° переставал коацервировать, хотя растворы при этом оставались прозрачными. При pH 7,5 и 8,0 белок оказался более стойким к температуре. Однако, как видно из табл. 1, способность к коацервации исчезала

всегда до появления помутнения. Такие же опыты на яичном альбумине не дали результатов. Яичный альбумин мутнел при всех pH одинаково и, будучи уже мутным, т. е. частично коагулированным, еще сохранял способность к коацервации при нагревании ниже 70°. Выше 70° яичный альбумин терял способность к коацервации.

Таким образом, в опытах с сыворотками крови лягушки и лошади и с яичным альбумином денатурация, сопровождающаяся изменением коллоидного состояния, делала белок не способным к коацервации. В опытах же с сывороточным альбумином для этого оказалось вполне достаточно одних молекулярных сдвигов.

Ультрафиолетовые лучи при комнатной температуре вызывают в белке как молекулярные, так и коллоидные изменения. Если же облучение производится при 0°, то молекулярные сдвиги не сопровождаются коллоидными (<sup>9</sup>). Поэтому опыты по воздействию лучистой энергии ставились нами как при комнатной температуре, так и при 0°. Капелька сывороточного или яичного альбумина концентрации 0,1% в фосфатном буфере (pH 7,4) помещалась на предметное стекло с углублением, прикрывалась кварцевым покровным стеклом и освещалась ртутно-кварцевой лампой. Часовое облучение не препятствовало коацервации. После 2-часового воздействия ультрафиолетовых лучей коацервация почти полностью прекращалась (табл. 1). Однако в ряде опытов мы все-таки наблюдали появление единичных очень мелких капелек коацервата. Из табл. 1 видно, что результаты опытов при комнатной температуре и при 0° совершенно одинаковы. Следовательно, белок, денатурированный ультрафиолетовыми лучами, теряет способность к коацервации с красителем даже в том случае, если происшедшие в нем изменения ограничиваются молекулярными сдвигами и не отражаются на коллоидном состоянии, что имеет место в опытах при 0°.

Действие мочевины отличается от действия температуры и ультрафиолетовых лучей тем, что она, денатурируя белок, препятствует его коагуляции. Поэтому изучение влияния мочевины на коацервационную способность белка представлялось особенно интересным.

Мочевина добавлялась к 0,1% раствору белка в фосфатном буфере в сухом виде в таком количестве, чтобы ее конечная концентрация равнялась 4, 6, 8 и 10 молям. Через 15 мин. и через 1 час исследовалась коацервационная способность таких растворов. Так как мочевина, повидимому, действует на белок быстро, результаты наблюдения через 15 мин. и через 1 час не отличались друг от друга (см. табл. 1). Сыворотка крови лягушки и яичный альбумин теряют способность к коацервации уже в 4М мочеvine. В 6М растворе перестает коацервировать сывороточный альбумин. Наконец, в 8М мочеvine прекращается коацервация лошадиной сыворотки. Вместо многочисленных, интенсивно окрашенных капелек коацервата, которые появляются под влиянием красителя в белке, не содержащем мочевины, во всех этих случаях жидкости смешиваются равномерно; лишь иногда в них заметны очень мелкие, слабо окрашенные хлопья. Можно было предположить, что присутствие мочевины в растворе препятствует реакции коацервации независимо от ее действия на белок. Для проверки этого предположения мы исследовали коацервацию небелковых коллоидных растворов (гуммиарабик и нуклеинат натрия) в присутствии тех же концентраций мочевины. Оказалось, что даже 10М мочевина не препятствует коацервации гуммиарабика и нуклеината натрия. Это показывает, что присутствие мочевины само по себе не влияет на коацервацию.

Следовательно, при действии мочевины, так же как в случае нагрева в щелочной среде и облучения ультрафиолетом на холоду, денатурационные изменения белковых молекул, даже не осложненные

Таблица 1

Влияние тепловой, ультрафиолетовой и лучистой денатурации белков на коацервацию их с сернокислым нильским голубым

	pH	Температура в °C						Уф лучи				Мочевина в молях					
								0°		20°							
		50	55	60	65	70	75	80	1 ч.	2 ч.	1 ч.	2 ч.	4	6	8	10	
Сыворотка крови лягушки . .		+	—	—										—	—	—	—
Сыворотка крови лошади . .			+	+	—	—								+	+	—	—
Сывороточный альбумин . .	6,5			+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
	7,0			+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
	7,4			+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
	8,0		+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
Яичный альбумин . .	6,5				+	—	—	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—
	7,0				+	—	—	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—
	7,4				+	—	—	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—
	8,0				+	—	—	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—

Примечание. + большое количество капель коацервата, ± единичные капли коацервата, — коацервации нет.

коагуляцией, лишают белок способности вступить в реакцию коацервации с красителем. Денатурированный белок не может коацервировать, повидимому, не только с красителями, но и с другими веществами. В пользу этого говорят наблюдения Бунгенберг де Йонга<sup>(10, 11)</sup>, показавшего, что комплексный коацерват сывороточного альбумина с гуммиарабиком и клупеином постепенно разрушается вследствие денатурации белкового компонента.

Итак, белки, денатурированные ацетоном, температурой, ультрафиолетовыми лучами и мочевиной, теряют способность к коацервации. Это дает основание предполагать, что и в клетке гранулообразование при повреждении может прекращаться вследствие денатурации белков протоплазмы, которая вызывается непосредственным действием агента или наступает в результате нарушения обмена веществ, необходимого для поддержания клеточных белков в нативном состоянии.

Институт экспериментальной медицины  
Академии медицинских наук СССР

Поступило  
21 VII 1950

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Д. Н. Насонов и В. Я. Александров, Реакция живого вещества на внешние воздействия, Изд. АН СССР, 1940. <sup>2</sup> В. Я. Александров, Бюлл. эксп. биол. и мед., 25 (3), 233 (1948). <sup>3</sup> Н. Г. Хлопин, Arch. exp. Zellforsch., 4, 462 (1927). <sup>4</sup> Б. В. Кедровский, Усп. совр. биол., 15, 295 (1942). <sup>5</sup> Л. Ф. Ларионов и Е. М. Брумберг, ДАН, 54 (3), 267 (1946). <sup>6</sup> Н. Л. Фельдман, ДАН, 52, 817 (1948). <sup>7</sup> А. Д. Браун, Взаимодействие нативных и денатурированных белков с красителями, Диссертация ИЭМ, 1949. <sup>8</sup> W. T. Bovie, Science, N. S., 37, 373 (1913). <sup>9</sup> J. H. Clark, Journ. Gen. Physiol., 19, 199 (1936). <sup>10</sup> H. G. Bungenberg de Jong u. Ong Sian Gwan, Biochem. Zs., 221, 182 (1930). <sup>11</sup> H. G. Bungenberg de Jong, W. A. L. Dekker u. Ong Sian Gwan, ibid., 221, 392 (1930).