

С. Н. АЛЕКСАНДРОВ, С. Е. МАНОЙЛОВ и Б. А. ОРЛОВ

**К ВОПРОСУ О ВЫХОДЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ  
ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЕЙ**

*(Представлено академиком А. И. Опариным 15 II 1952)*

А. Н. Белозерский<sup>(1)</sup> на растительных, а затем С. Е. Манойлов, Б. А. Орлов и О. Н. Сеткина<sup>(2)</sup> на животных объектах обнаружили, что нуклеиновые кислоты образуют два типа связи с белком. Один тип — некрепкая солеобразная связь, характерная для рибонуклеопротеида, находящегося, как известно, в цитоплазме и в ядрышке. Другой тип — крепкая связь, характеризует так называемый прочно связанный нуклеопротеид, состоящий из дезоксирибонуклеиновой кислоты и белка. Последний находится в клеточных ядрах.

В этих исследованиях, однако, не был затронут вопрос о биологическом значении связи между белком и нуклеиновой кислотой, а именно, о том, происходит ли в клетке разрыв этих связей и, если происходит, то при каких условиях и каким физиологическим или патологическим состояниям это соответствует.

Л. Ф. Ларионовым и Е. М. Брумбергом<sup>(3)</sup> в исследованиях на ультрафиолетовом микроскопе было отмечено, что в цитоплазме необратимо поврежденных нормальных и опухолевых клеток происходит уменьшение и даже исчезновение поглощения ультрафиолетовых лучей (длина волны 2540—2800 Å), обусловливаемого, в основном, рибонуклеиновой кислотой.

Далее Л. Ф. Ларионовым<sup>(4)</sup> было высказано предположение, что при повреждении клеток, вследствие возникающих при этом денатурационных изменений белков цитоплазмы, происходит нарушение связи между белком и нуклеиновой кислотой. Последняя отделяется от белка и, не удерживаясь более в цитоплазме, покидает ее. Позднее А. Н. Трифонова<sup>(5)</sup>, также на основании косвенных данных, пришла к заключению, что нуклеиновые кислоты вымываются из цитоплазмы при необратимом повреждении клетки. Данная работа посвящена специальному исследованию этого вопроса.

Основным объектом исследования служила ткань перевиваемой крысиной рабдомиобластомы, и лишь в сравнительно ограниченных масштабах опыты были воспроизведены на печеночной ткани крысы. Разрабатывая схему постановки опыта, мы исходили из представления, что нуклеиновая кислота удерживается в клетке только лишь физико-химическими или химическими связями с белком; при нарушении этих связей они должны свободно диффундировать из клетки. Согласно этому мы, нанося повреждение, исследовали жидкость, окружающую поврежденную ткань. Для того чтобы облегчить диффузию, ткань после извлечения из организма рассекалась бритвой на срезы толщиной в 100—200 м. Эта операция, вызывавшая механическое повреждение ча-

сти клеток, могла сама по себе приводить (и, как выяснилось впоследствии, приводила) к освобождению нуклеиновых кислот. Для того чтобы отмыть от них срезы, последние предварительно ополаскивались в течение 30 мин. в 20 порциях рингеровской жидкости. После этого тканевые срезы подвергались повреждающему воздействию. Последнее осуществлялось перенесением срезов на 15 мин. в гипотонические рингеровские растворы или рингеровскую жидкость повышенной температуры\*.

По окончании воздействия срезы переносились в рингеровскую жидкость при 38° и окрашивались витально 0,005% раствором нейтрального красного. В части опытов витальная окраска производилась одновременно с воздействием. Характер витальной окраски давал нам возможность судить о том, находятся ли клетки в нормальном состоянии (гранулярный тип окраски) или же в состоянии паранекроза, при котором белки протоплазмы обнаруживают денатурационные изменения<sup>(6)</sup>. Окрашивая срезы через различные сроки по окончании воздействия, мы могли судить об обратимости нанесенного повреждения. Таким образом, метод витальной окраски давал нам возможность увязать данные о выходе нуклеиновых кислот из клетки с физиологическим ее состоянием. Жидкость после удаления тканевых срезов центрифугировалась для освобождения от грубой взвеси и подвергалась исследованию на присутствие нуклеиновых кислот.

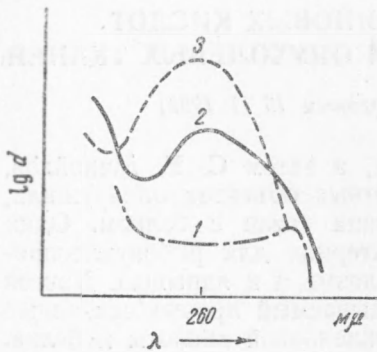


Рис. 1. 1 — контроль, 2 — 0,25 рингера 15 мин., 3 — тимонуклеиновая кислота в конц. 0,05%

Мы начали работу с опытов по воздействию гипотонических рингеровских растворов. Оказалось, что при действии растворов, не вызывающих изменений нормального типа витальной окраски, т. е. не вызывающих паранекротических изменений в клетках (0,75—0,5 р\*\*), нуклеиновые кислоты в жидкости, омывающей срезы, не обнаруживаются; имеется лишь незначительная примесь белка. Стоит только перейти эту границу и вызвать паранекротические изменения в клетках, хотя бы и обратимые (0,25 р), как в окружающую жидкость начинает поступать нуклеиновая кислота, которая может быть обнаружена как спектрографически, так и химически. На рис. 1 приведены кривые поглощения, полученные в одном из таких опытов. Кривые поглощения чистого раствора нуклеиновой кислоты (№ 3) и жидкости 0,25 р, в которой в течение 15 мин. находились тканевые срезы, носят один и тот же характер. В контроле (пребывание в нормальном рингеровском растворе) наблюдается лишь слабое поглощение с максимумом в области 2800 Å, соответствующим поглощению многих белков.

Для того чтобы убедиться, что мы имеем дело с нуклеиновой кислотой, а не с другими нуклеотидами, обладающими таким же максимумом поглощения в ультрафиолетовой области, в исследуемой жидкости определялся фосфор кислотонерастворимой фракции. При взятии в опыт 15 г тканевых срезов в окружающей жидкости обнаруживалось 0,35—

\* При действии гипотонии срезы после промывания споласкивались в течение 5 мин. в гипотоническом растворе и лишь после этого переносились на 15 мин. в новую порцию жидкости с той же концентрацией солей. Это было необходимо, так как иначе вместе со срезами могло быть занесено значительное количество изотонического рингеровского раствора.

\*\* Так мы обозначаем для краткости растворы с концентрацией солей, соответствующей 0,75 и 0,5 рингеровского раствора.

0,42 мг фосфора этой фракции. Во всех этих опытах фельгеновская реакция оказывалась неизменно отрицательной. Следовательно, обнаруженная нами нуклеиновая кислота была рибонуклеиновой. Наконец, если повреждение было необратимым (действие дистиллированной воды), фельгеновская реакция оказывалась положительной; это свидетельствовало о выходе и дезоксирибонуклеиновой кислоты.

Опыты, проведенные с тепловым воздействием, привели к аналогичным результатам: при обратимом повреждении ( $43 \pm 0,1^\circ$ ) наблюдался выход рибонуклеиновой кислоты, при необратимом ( $44^\circ$  и выше) диффундирует из клетки и дезоксирибонуклеиновая кислота. Спектрографически обнаружить здесь нуклеиновые кислоты оказалось вначале затруднительным, так как наряду с ними в жидкость диффундировали некоторые продукты распада белка с широкой областью поглощения, маскировавшей нуклеиновые кислоты. Однако с помощью метода хроматографической адсорбции на крахмале их удалось разделить (разделение фракций проводилось под контролем поглощения в ультрафиолетовых лучах в приборе, предложенном Е. М. Брумбергом (7)).

На рис. 2 представлены кривые до и после хроматографического разделения; как видно из рисунка, первая фракция обладает типичным для нуклеиновых кислот поглощением в области 2620 Å.

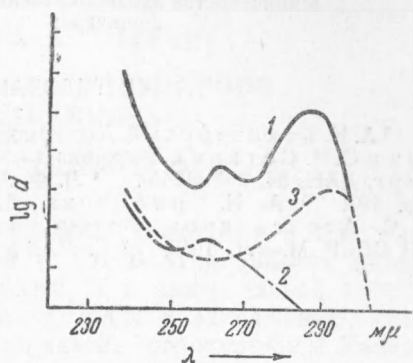


Рис. 2. 1 —  $45^\circ$  до разгонки; 2 —  $43^\circ$ , 1-я фракция после разгонки; 3 —  $43^\circ$ , 2-я фракция после разгонки

### Обсуждение результатов

Итак, рибонуклеиновая кислота отделяется от белка и диффундирует из клетки протеинов. Поскольку такие же изменения белкового компонента клетки характеризуют (6) и состояние физиологического возбуждения, можно думать, что и в этом случае рибонуклеиновая кислота отделяется от белка. Возможно, что в состоянии физиологического покоя, который, по Насонову и Александрову, представляет взаимопротиворечивое единство процессов денатурации и ренативации клеточных белков, рибонуклеиновая кислота легко отделяется от белка, вовлекается в обменные процессы с другими веществами, а в следующий момент вновь воссоздается рибонуклеиновый комплекс.

Частичный выход рибонуклеиновой кислоты из клетки при повреждении может быть с этой точки зрения объяснен тем, что освобожденный нуклеотид при рассмотренном обмене веществ целиком не используется и часть его диффундирует в окружающую среду.

Наши данные свидетельствуют о том, что требуются более глубокие изменения клетки и ее обмена веществ для того, чтобы вызвать разрушение дезоксирибонуклеинового комплекса и привести к выходу дезоксирибонуклеиновой кислоты из клетки. При этом, повидимому, разрушается и более прочный комплекс рибонуклеиновой кислоты с белком, существование которого мы предполагаем в цитоплазме.

Таким образом, оказывается, что по мере развития повреждения в круг связанных с ним процессов втягиваются все новые компоненты клетки. Это может служить объяснением многофазности функциональных сдвигов, наблюдавшихся при повреждении — возбуждении.

В условиях организма выход нуклеиновых кислот при повреждении из клетки имеет, повидимому, значение при ликвидации последствий

повреждения. Уже давно отмечалось, что нуклеиновые кислоты, а также их производные при попадании в кровяное русло вызывают увеличение количества лейкоцитов в крови; они стимулируют костный мозг к выделению в периферическую кровь полиморфноядерных лейкоцитов.

Кроме того, нуклеиновые кислоты, выходящие из клетки при повреждении, могут, возможно, стимулировать обменные процессы в окружающих тканевых элементах, способствуя тем самым процессу регенерации тканей.

Центральный рентгенологический, радиологический  
и раковый институт  
Министерства здравоохранения СССР  
Ленинград

Поступило  
19 I 1952

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> А. Н. Белозерский, Диссертация, МГУ, 1944. <sup>2</sup> С. Е. Манойлов, В. А. Орлов и О. Н. Сеткина, Биохимия, **13**, 337 (1948). <sup>3</sup> Л. Ф. Ларионов и Е. М. Брумберг, ДАН, **54**, 267 (1946). <sup>4</sup> Л. Ф. Ларионов, Тр. 4-й сессии АМН СССР, 1948, стр. 193. <sup>5</sup> А. Н. Трифонова, ДАН, **61**, 917 (1949). <sup>6</sup> Д. Н. Насонов и В. Я. Александров, Реакция живого вещества на внешнее воздействие, изд. АН СССР, М.—Л., 1940. <sup>7</sup> Е. М. Брумберг, ДАН, **74**, № 4 (1950).