

Н. Л. ФЕЛЬДМАН

О ПРИЧИНАХ ПОДАВЛЕНИЯ ГРАНУЛООТЛОЖЕНИЯ КРАСИТЕЛЕЙ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ КЛЕТОК

(Представлено академиком А. И. Опариным 15 I 1953)

Для суждения о функциональном состоянии клеток в биологии и медицине широко используется метод прижизненного окрашивания, основанный на том, что гранулярное отложение красителей в животных клетках при различных повреждающих воздействиях нарушается и сменяется диффузной окраской (1). Крайне существенным и в теоретическом и в практическом отношении является выяснение причины этого явления.

Гранулярное отмишивание происходит вследствие аутокомплексной коацервации красителей с цитоплазматическими белками (2). При повреждении, согласно теории Насонова и Александрова, происходит денатурация клеточных белков, которая и приводит к появлению диффузной окраски (3). Нами было показано, что денатурированные белки не способны к коацервации (4). Это дало возможность допустить, что денатурация цитоплазматических белков является в то же время одной из причин прекращения гранулообразования при повреждении. Однако при повреждениях клеток наблюдается целый ряд других физико-химических сдвигов, которые сами по себе могут влиять на характер распределения красителей. Особенного внимания заслуживает изменение внутриклеточной реакции в кислую сторону, наблюдающееся в цитоплазме при некоторых физиологических и патологических процессах (например, утомление), а также при повреждающем действии целого ряда факторов (нагревание, наркотики, механическое воздействие) (3, 5). Так как сдвиг pH в кислую сторону часто сопровождается нарушением гранулообразования (3, 5), интересно было исследовать влияние pH на коацервацию белка с красителем.

Для работы были использованы следующие белковые препараты: яичный альбумин, сывороточный альбумин и желатина. Для контроля исследовалась коацервация небелковых коллоидных растворов: гуммиарабика и рибонуклеината натрия.

Из группы основных красителей были взяты: нильский голубой серноокислый, яркий крезильовый синий, толуидиновый синий, метиленовый синий, нейтральный красный, таннингелиотроп, кристаллический фиолетовый, родамин, пиронин, иризамин. Из группы кислотных красителей употреблялись: трипановый красный, эозин, эритрозин, анилиновый оранжевый, тропеолин, метиловый оранжевый и индигокармин.

Для получения коацервата на предметном стекле осторожно смешивались капли красителя и буференного коллоидного раствора (2). Для выяснения влияния солевого состава на коацервацию употреблялись следующие буферные смеси: ацетатная (pH 3,6—5,6), фосфатноцитратная (pH 2,2—8,0), фосфатная (pH 5,6—8,0), боратная (pH 8—10) и смесь Na_2HPO_4 — NaOH (pH 10,9—12). Наблюдения, как правило, велись при комнатной температуре. С желатиной и нуклеинатом натрия опыты ставились при 37°.

Яичный и сывороточный альбумины образуют коацерват с рядом основных красителей (см. табл. 1). Эти красители относятся к группе так называемых гранулярных красителей, так как в протоплазме неповрежденных клеток они могут откладываться в виде гранул (6). Основные

Коллоиды	Гуммиарабик 0,2%					Нуклеионат натрия 0,2%					Желатина 0,4%						
	pH					pH					pH						
Красители	10	8	6	4	2,2	10	8	6	4	2,2	12	11	10	8	6	4	2,2
Основные																	
Нильский голубой	o	+	+	-	-	+	+	+	+	+	o	o	o	+	+	-	-
Яркий крез. синий	o	+	+	+	+	o	o	o	o	o	o	o	o	+	-	-	-
Нейтр. красный	o	+	+	+	+	к	o	o	o	o	к	к	+	+	+	-	-
Танингелиотроп.	-	-	-	-	-	o	o	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Толлуид. синий	o	+	+	+	+	o	o	o	o	o	o	o	o	-	-	-	-
Метилен. синий	-	-	-	-	-	o	o	o	o	o	-	-	o	-	-	-	-
Крист. фиолет.	o	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Родамин	-	-	-	-	-	o	o	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Пиронин	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Иризамин	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Кислотные																	
Еозин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	o	-	-	-	-	+	+	
Эритрозин	-	-	-	o	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	o
Трипанов. красн.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	o	-	o	o	+	+	+	
Тропеолин	-	-	к	к	к	-	к	к	к	к	-	-	-	+	+	+	
Анили. оранже.	-	-	-	-	-	-	-	-	o	o	-	-	-	+	+	+	
Индигокармин	-	-	o	o	o	-	o	o	o	o	-	o	-	+	+	+	
Метиловый оранже.	-	-	-	o	o	-	-	-	o	o	-	-	-	+	+	+	

Примечание: + коацерват; o — аморфный осадок; к — кристаллы; — коа

диффузные красители, которые в животных клетках не образуют гранул и окрашивают протоплазму диффузно, к коацервации не способны (6). Коацерват яичного и сывороточного альбумина с основными красителями возникает при pH 6—11, а в некоторых случаях и при pH 12 (метиленовый синий — табл. 1). При pH ниже 6 гранулярные красители теряют способность давать коацерват. Диффузные красители не коацервируют при всех исследованных pH. Состав буфера не сказывается на результатах. Следовательно, результаты наших опытов определялись влиянием реакции среды, а не солевым составом.

Коацервация происходит при взаимодействии двух противоположно заряженных частиц, сопровождающемся уменьшением заряда и разрушением диффузной гидратной оболочки (7, 10). Следовало бы поэтому ожидать, что белки, будучи амфолитами, при pH, лежащих ниже изоэлектрической точки (ИЭТ), будут вступать в коацервацию с кислотными красителями. Однако опыт показал, что яичный и сывороточный альбумины при pH 5,6—2,7 не дают коацервата не только с основными, но и с кислотными красителями. С последними образуется интенсивно окрашенный аморфный осадок, возникающий вследствие осаждения белка красителем.

желатина заряжена отрицательно и коацервирует с катионом основного красителя. Ниже ИЭТ положительно заряженная желатина дает коацерват с анионами (в данном случае кислотные красители). Растворы гуммиарабика и нуклеината натрия при разных рН не меняют знак заряда и поэтому коацервируют только с основными красителями. Неспособность сывороточного и яичного альбуминов к коацервации с кислотными красителями при низких рН можно было бы объяснить денатурацией. Однако по литературным данным непродолжительное пребывание в кислой среде не вызывает денатурационных изменений в белке. Во всяком случае при нейтрализации полностью восстанавливаются все нативные свойства. Это подтверждается и нашими наблюдениями над коацервационной способностью подкисленных и затем нейтрализованных белковых растворов. Сывороточный и яичный альбумины при рН, лежащих ниже ИЭТ, не дают коацервата ни с основными, ни с кислотными красителями (табл. 1). После нейтрализации, однако, способность к коацервации с основными красителями полностью восстанавливается*. Против денатурации альбуминов при низких рН говорят также наблюдения Бунгенберг де Йонга⁽¹²⁾, получившего при рН 2,4—4,9 коацерват сывороточного альбумина с гуммиарабиком. Повидимому, при низких рН альбумины сохраняют свои нативные свойства и теряют способность только к аутокомплексной коацервации с кислотными красителями (т. е. анионами). Это явление может быть объяснено, исходя из работ Клотца, обнаружившего, что некоторые белки (сывороточный альбумин, яичный альбумин и др.) обладают большим сродством к анионам, чем к катионам^(9, 13). Присоединение анионов к этим белкам сопровождается значительной дегидратацией, вследствие чего, возможно, и образуется аморфный осадок, а не жидкие капли коацервата.

Такая точка зрения подтверждается также тем, что белки, обладающие меньшим сродством к анионам (например, пепсин), могут давать коацерват с кислотными красителями при низких рН.

Нами было показано ранее, что денатурация белков не только обуславливает появление диффузной окраски, но и приводит к подавлению гранулообразования. Вышеизложенный материал показывает, что при снижении рН ниже 6 становится невозможной коацервация белка с основными красителями, несмотря на то, что белок сохраняет свои нативные свойства. Так как при повреждении часто наблюдается сдвиг внутриклеточной реакции в кислую сторону, можно предположить, что прекращение гранулообразования происходит не только вследствие самой денатурации, но и в результате повышения концентрации водородных ионов в клетке. Этим, возможно, объясняются случаи подавления гранулообразования, не сопровождающиеся появлением диффузной окраски протоплазмы.

Поступило
4 XII 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Я. Александров, Тр. АМН СССР, 3, 10 (1949). ² Н. Л. Фельдман, ДАН, 62, 817 (1948). ³ Д. Н. Насонов, В. Я. Александров, Реакция живого вещества на внешнее воздействие, изд. АН СССР, 1946. ⁴ Н. Л. Фельдман, ДАН, 74, 1139 (1950). ⁵ В. Я. Александров, *Protoplasma*, 17, 161 (1932). ⁶ Н. Л. Фельдман, ДАН, 59, 961 (1948). ⁷ А. С. Трошин, Изв. АН СССР, сер. биол., 4, 425 (1948). ⁸ Н. А. Нагорная, Уч. зап. Харьк. гос. ун-та, 25, 199 (1947). ⁹ И. Клотц, Сборн. Аминокислоты и белки, М., 1952. ¹⁰ Н. G. Bungenberg de Jong, H. R. Kruyt, *Kolloid. Z.*, 50, 39 (1930). ¹¹ Н. G. Bungenberg de Jong, J. Lens, *Biochem. Z.*, 254, 15 (1932). ¹² Н. G. Bungenberg de Jong, Ong Sian Gwan, *ibid.*, 221, 182 (1930). ¹³ J. M. Klotz, E. W. Gellwitz, J. M. Urquhard, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 209 (1952).

* Яичный альбумин по сравнению с сывороточным оказался более чувствительным к действию рН. Необратимые изменения в нем наступают после 16-часового пребывания в кислой среде. Сывороточный альбумин сохраняет способность в коацервации после нейтрализации через 24 часа, и только через 40 час. коацервационные свойства не восстанавливаются.