

А. К. БЕЛОУСОВА

**ИЗМЕНЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКА В ПРОЦЕССЕ
МАЛИГНИЗАЦИИ ПЕЧЕНИ***(Представлено академиком А. И. Абрикосовым 5 V 1954)*

В изучении патогенеза рака очень важное значение имеет вопрос — по каким признакам можно определить начало болезни? Инфильтрирующий, деструктивный рост, принимавшийся долгое время за главный признак злокачественности опухоли, появляется лишь на поздних стадиях ракового заболевания. Гораздо более ранние стадии рака могут быть обнаружены при помощи цитологических и гистохимических исследований, показавших, что раковые клетки с характерной для них атипией, резким полиморфизмом, накоплением базофильного вещества, увеличением ядер и ядрышек и способностью к митотическим и амитотическим делениям появляются в опухоли задолго до начала инфильтрирующего роста (¹⁻⁶). Наконец, биохимические исследования позволяют обнаружить нарушения в метаболизме тканей, предшествующие морфологическим изменениям и являющиеся первыми признаками начинающейся малигнизации (⁷⁻⁹). Однако сущность процессов, лежащих в основе превращения нормальной клетки в раковую, до сих пор не выяснена. Можно лишь предполагать, что наиболее существенное значение для процесса малигнизации имеют изменения в нуклеопротеидном обмене клетки.

Возможности для постановки исследований в данном направлении значительно расширились в последние годы благодаря разработке методов фракционирования гомогенатов нормальных и опухолевых тканей, позволяющих разделить клетку на отдельные компоненты и изучать тончайшие изменения в ее структуре и биохимизме (^{10, 11}).

Целью настоящего исследования являлось изучение при помощи метода фракционирования гомогенатов изменений нуклеопротеидного обмена клеток печени в процессе их малигнизации. Содержание нуклеиновых кислот в печени служило для нас показателем функциональной активности ее клеток, внутриклеточное же распределение нуклеиновых кислот и белка характеризовало особенности структуры клетки. Параллельно Е. Л. Кочаровой (⁶) и З. А. Рябининой проводились цитологические и гистохимические исследования печени на разных стадиях малигнизации.

Объект и методы исследования. Опыты проводились на молодых белых крысах, преимущественно самках. Животные находились на синтетической диете с повышенным (21%) содержанием жира. Опытные животные получали ежедневно в течение 8—12 мес. с пищей по 6 мг орто-аминоазотолуола. Контрольные животные не получали канцерогенного вещества. Опытные и контрольные животные убивались спустя 1—2 недели, 1, 3, 4 и 5 мес. после начала опыта и в дальнейшем через каждые 2—3 мес. вплоть до формирования гепатомы. Всего в опытах было использовано 62 крысы. Печень только что убитого и обескровленного животного взвешивалась и гомогенизировалась в 7-кратном объеме забуференного (рН 7,4) изотонического раствора сахарозы.

Полученный гомогенат разделялся на три фракции: ядра, митохондрии и центрифугат. Ядра отделялись 10-минутным центрифугированием при ускорении 600 *g* и последующими отмывками и центрифугированием по 5 мин. при 500 и 400 *g*. Митохондрии отделялись центрифугированием в течение 10 мин. при 8500 *g*. Оставшийся после отделения ядер и митохондрий центрифугат содержал субмикроскопические гранулы (микросомы) и негранулярную часть протоплазмы (гиалоплазму). Чистота каждой фракции проверялась просмотром мазков под микроскопом с применением специфических окрасок. Температура во время фракционирования поддерживалась около 0°. Гомогенат и его фракции доводились до определенного объема и использовались для определения нуклеиновых кислот методом Шмидта и Таннгаузера (¹²) и белка — микрометодом Кьельдаля.

Полученные результаты подвергались статистической обработке по формулам для малых выборок. Достоверность разности (P_d) определялась по таблице Стьюдента и выражалась в процентах.

Результаты исследования. В условиях наших опытов гепатома развивалась практически у всех животных спустя 16—24 мес. после начала опыта. Малигнизация печени под влиянием вводимого в организм крысы канцерогенного вещества может быть обнаружена спустя несколько месяцев после начала опыта, даже при макроскопическом исследовании. Печень обычно увеличивается в размерах, уплотняется, поверхность ее становится крупнозернистой. Нередко наблюдается жировое перерождение. На 15—16-м мес. можно наблюдать формирование гепатомы. Чаще всего опухоль имеет вид уплотненных бугров диаметром 5—15 мм, окрашенных несколько бледнее остальной поверхности печени, иногда же рассеяна по всему органу и обнаруживается только микроскопически. Общее состояние подопытных животных в первые 10—12 мес. опыта остается удовлетворительным. В более поздние сроки появляются симптомы болезненного состояния — потеря аппетита, резкое истощение, авитаминозы. Часть животных погибает.

Данные по изменению содержания и внутриклеточного распределения нуклеиновых кислот и белка в процессе малигнизации печени приведены в табл. 1.

В табл. 1 обращают на себя внимание значительные колебания в содержании РНК на 1 г печени контрольных животных, убитых в разные сроки опыта, т. е. закономерное падение содержания РНК в печени с возрастом. Аналогичные данные получены и в отношении содержания белка на 1 г печени контрольных животных разного возраста. Содержание ДНК на 1 г печени контрольных животных остается весьма постоянным в течение всего опыта.

Приведенные в табл. 1 данные по внутриклеточному распределению нуклеиновых кислот и белка в нормальной печеночной клетке убеждают нас в том, что структура ее весьма устойчива и мало меняется с возрастом. Клетки нормальной печени богаты митохондриями, в которых локализована половина всей РНК и до 40% белка.

Под влиянием вводимого в организм крысы канцерогенного вещества наблюдаются закономерные изменения как в общем содержании нуклеиновых кислот, так и в распределении их между структурными элементами клетки.

В изменении содержания РНК на 1 г печени опытных животных наблюдаются периодические понижения и повышения (табл. 1, рис. 1). Спустя 1—2 недели после начала введения канцерогенного вещества происходит некоторое падение содержания РНК, затем повышение до нормы (1—4 мес.); начиная с 5 мес. наблюдается довольно значительный и длительный подъем выше нормы, сменяющийся резким падением к 10—12 мес. и быстро наступающим новым подъемом выше нормы (14—20 мес.). Содержание ДНК в первые 6—8 мес. опыта не меняется.

Таблица 1

Изменение содержания и внутриклеточного распределения нуклеиновых кислот и белка в процессе развития индуцированной гепатомы

Длительность опыта		1—2 недели		1—4 мес.		5—6 мес.		7—8 мес.		10—20 мес.	10—12 мес.	14—15 мес.	16—20 мес.
		контр.	опыт	контр.	опыт	контр.	опыт	контр.	опыт	контр.		опыт	
Число животных		3	3	4	7	6	6	6	6	6	10	2	6

Содержание Р _{ннк} в γ /г сырой ткани (над чертой) и в % гомогената (под чертой)													
Гомогенат	920±98	750±23	832±22	900±60	503±9	681±75	695±22	850±135	561±30	471±26	620±20	749±20	
1. Ядра	100±11	100±3	100±2,6	100±6,7	100±2	100±11	100±3	100±15,8	100±5	100±5	100±3	100±2,5	
	412	80	60	60	74	81	410	122	56	52	86	89	
2. Митохондрии	12,1	10,7	7,2	6,7	14,7	12,0	15,8	14,3	10,0	11,0	14,0	11,8	
	380	271	413	372	239	222	282	300	238	150	218	249	
3. Центрифугат	41,3	36,1	49,7	41,3	47,5	32,5	40,6	35,3	44,3	31,8	35,0	33,2	
	428	457	382	474	210	377	353	444	283	266	390	444	
	46,6	62,2	46,0	52,6	40,8	55,4	51,0	52,0	50,0	56,6	63,0	59,0	
(1 + 2 + 3)	920	808	861	906	523	680	745	866	574	468	694	782	
P _d в %	100	109	103	100,6	103	99,9	107,4	102	104,3	99,4	112	104	
		87		50		96		84		95,6		99,8	

Содержание Р _{днк} в γ /г сырой ткани													
Гомогенат	270±39	250±50	230±2	273±36	212±30	222±17	285±15	231±29	224±1	165±12	218±17	232±20	
P _d в %	—	50	—	50	—	50	—	50	—	99,0	50	50	

Содержание белкового азота в мг/г сырой ткани (над чертой) и в % гомогената (под чертой)													
Гомогенат	—	—	32,3	32,7	20,7	22,6	24,4	19,0	21,4	21,1	—	30,1	
1. Ядра	—	—	100	100	100	100	100	100	100	100	—	100	
	—	—	2,7	2,3	3,04	4,25	2,6	3,25	2,72	4,3	—	5,0	
2. Митохондрии	—	—	8,5	7,0	14,7	18,8	10,7	17,2	12,7	20,5	—	16,7	
	—	—	9,8	11,3	7,9	6,45	11,1	5,75	7,0	5,3	—	9,0	
3. Центрифугат	—	—	31,1	34,7	38,2	28,5	45,3	30,2	32,8	25,3	—	29,9	
	—	—	17,0	18,7	9,5	12,05	10,4	10,1	8,8	9,8	—	17,0	
	—	—	52,8	57,0	45,8	53,4	42,5	53,2	44,3	46,8	—	56,8	
(1 + 2 + 3)	—	—	29,5	32,4	20,4	22,75	24,1	19,4	18,53	19,4	—	31,0	
	—	—	92,4	98,7	98,7	100,7	98,5	100,6	89,8	92,6	—	103	

Лишь через 10—12 мес. наблюдается значительное падение, совпадающее по времени с периодом низкого содержания РНК. По данным Е. А. Кочаровой⁽⁶⁾, периоду резкого падения содержания обеих нуклеиновых кислот в клетках малигнизированной печени предшествует волна амитотических делений.

Первоначальные колебания в содержании РНК на 1 г печени опытных животных не сопровождаются сколько-нибудь устойчивыми изменениями структуры ее клеток.

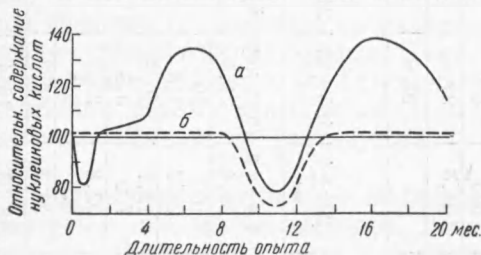


Рис. 1. Изменение относительного содержания (в процентах к контролю) нуклеиновых кислот в печени при развитии индуцированной гепатомы. *а* — РНК, *б* — ДНК

Только спустя 5 мес. после начала опыта мы наблюдали перераспределение РНК и белка между структурными элементами клетки, выразившееся в обеднении клетки митохондриями и обогащении микросомами и гиалоплазмой. В измененной под действием канцерогенного вещества клетке печени митохондрии содержат не половину, как в норме, а всего $\frac{1}{3}$ РНК и белка, а микросомы и гиалоплазма $\frac{2}{3}$ (рис. 2). Мы полагаем, что подобного рода перестройка структуры печеночной клетки является первым устойчивым признаком начавшейся малигнизации, поскольку новое соотношение между ее структурными элементами сохраняется на всех последующих стадиях развития опухоли, включая гепатому. Из литературы известно, что значительное преобладание микросом и гиалоплазмы характерно для клеток малодифференцированных эмбриональных тканей⁽¹³⁾. Таким образом, мы приходим к заключению, что малигнизация печеночной клетки связана в известной мере с ее дедифференцировкой. Утрачивая отчасти свойственную ей, как высокодифференцированной клетке, секреторную функцию, клетка печени в процессе малигнизации приобретает ярко выраженную способность к делению, что и подтверждается цитологическими данными⁽⁶⁾.

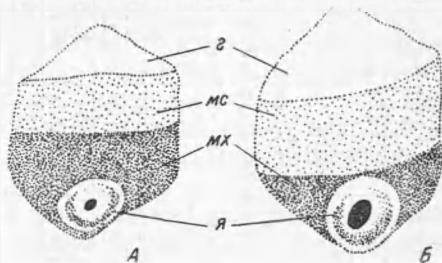


Рис. 2. Изменение структуры печеночной клетки при ее малигнизации (схема). *А* — нормальная клетка, *Б* — раковая клетка; *г* — гиалоплазма, *мс* — микросомы, *мх* — митохондрии, *я* — ядро

Институт экспериментальной биологии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
22 XII 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Л. М. Шабал, Сборн. Ранняя диагностика рака, под ред. Сереброва, М., 1948, стр. 210.
- ² Л. Ф. Ларионов, Тр. IV сесс. АМН СССР, стр. 195 (1948).
- ³ Г. И. Роскин, Уч. зап. МГУ, в. 20, Зоология, 328 (1939).
- ⁴ Г. И. Роскин, Г. В. Харлова, ДАН, 44, 418 (1944).
- ⁵ Т. С. Шведкова-Роше, Сборн. Вопросы цитологической диагностики рака, Киев, 1952, стр. 45, 69.
- ⁶ Е. А. Кочарова, Тр. АМН, 26; Вопросы онкологии, в. 6, 113 (1953).
- ⁷ И. Б. Збарский, Усп. совр. биол., 22, в. 2 (1946).
- ⁸ С. Р. Мардашов, Энзимология опухолей, М., 1948.
- ⁹ С. С. Дебов, Совр. пробл. онкол., в. 7(46), сер. Б, стр. 3 (1953).
- ¹⁰ Р. В. Хесин, Усп. совр. биол., 31, 71 (1951).
- ¹¹ W. Schneider, J. Biol. Chem., 176, 259 (1948).
- ¹² G. Schmidt, S. Tannhauser, ibid., 161, 83 (1945).
- ¹³ J. Brachet, Symp. Soc. Exp. Biol., 1, 201 (1947).