

ФИЗИОЛОГИЯ

Э. Я. ГРАЕВСКИЙ и Г. С. СТРЕЛИН

**О ВЗАИМООТНОШЕНИЯХ МЕЖДУ РАЗЛИЧНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ
ПОВРЕЖДЕНИЯ ИЗОЛИРОВАННОЙ МЫШЦЫ ЛЯГУШКИ,
ВЫЗВАННОГО ЗАМОРАЖИВАНИЕМ**

(Представлено академиком Л. А. Орбели 31 III 1947)

Повреждение протоплазмы клетки, даже обратимое, по Насонову и Александрову (1), вызывает изменения ее белковых компонентов, близкие к денатурационным. Характер изменений, возникающих в протоплазме в результате образования в ней льда, до настоящего времени

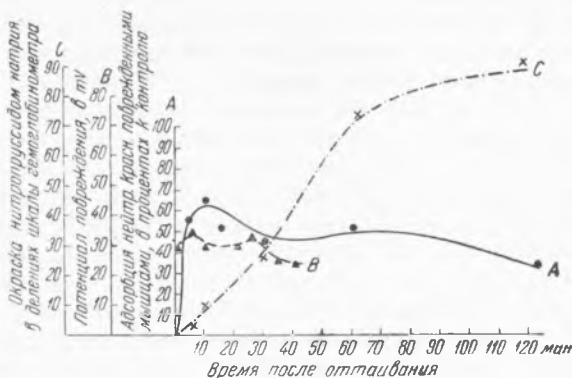


Рис. 1. Соотношение изменения адсорбционных свойств, потенциалов повреждения и нитропруссидной реакции в мышцах, убитых замораживанием через разные сроки после оттаивания. А — адсорбция нейтрального красного, В — потенциалы повреждения, С — нитропруссидная реакция

мало изучен. В связи с этим мы пытались выяснить, носят ли явления, возникающие в протоплазме под влиянием замораживания, специфический или неспецифический характер. Нами было прослежено развитие неспецифических признаков повреждения во времени в мышечной ткани лягушки (*m. gastrocnemius* и *m. sartorius*) после ее замораживания и оттаивания. Для этого мы провели наблюдения над изменением адсорбционной способности, пользуясь методом окраски, разработанным Брауном и Ивановым (2), и измеряли токи повреждения. Кроме того, мы пытались проследить изменение способности мышц к нитропруссидной реакции, предложенной Жиру и Бюльваром (3) и несколько нами видоизмененной. Последний критерий был введен в связи с тем, что активизация сульфгидрильных групп считается одним из наиболее характерных признаков процесса денатурации белков. Кроме того, нами делались и микроскопические наблюдения

над структурой поврежденных мышц. Повреждение мышц в наших опытах вызывалось их замораживанием в жидком воздухе.

В опытах с окраской был использован 0,25% раствор нейтрального красного. В каждом опыте через разные сроки после оттаивания мы окрашивали по три опытных и контрольных мышцы в течение 5 минут. Из них делались вытяжки краски подкисленным спиртом, которые затем колориметрировались. Суммарные результаты из 8 серий опытов представлены графически на рис. 1 сплошной линией. Кривая показывает отношение адсорбционной способности поврежденных мышц к контрольным во времени. Окрашивание контрольных мышц принято за 100%.

Измерение токов повреждения производилось при помощи компенсационной установки с зеркальным гальванометром. В этих опытах мышцы погружались в жидкий воздух не целиком, а наполовину — одним концом; другой конец мышц предохранялся от замораживания. После пятиминутного охлаждения и последующего оттаивания мышц, происходившего на воздухе при комнатной температуре, мы снимали разность потенциалов между поврежденным и интактным участками. Разность потенциалов выражалась в милливольты. Регистрация показаний гальванометра производилась сразу после оттаивания мышцы и затем повторялась каждые 5 минут. Результаты 7 серий опытов представлены на рис. 1 пунктирной линией. Кривая отображает суммарный результат всех наблюдений и показывает изменение разности потенциалов во времени.

В наблюдениях с нитропруссидной реакцией фиксация трихлоруксусной кислотой, которая применялась авторами использованной нами методики, была заменена замораживанием. В опытах с мышцами, непосредственно сразу после их оттаивания или через определенный срок после этого, объекты обрабатывались в течение 4 мин. 5% раствором уксуснокислого цинка и затем переносились также на 4 мин. в 10% раствор нитропруссида натрия. Для количественного выражения получающегося окрашивания мышц нитропруссидом натрия мы применили сравнение окраски просветленных в глицерине мышц (окраска в глицерине может сохраняться, как показал опыт, в течение долгого времени) со шкалой клиновидного гемоглобинометра, цвет которого близок к окраске нитропруссидом натрия. На рис. 1 прерывистая кривая иллюстрирует изменение способности мышц к нитропруссидной реакции во времени. Она составлена на основании 3 полных серий опытов и ряда наблюдений, сделанных непосредственно после оттаивания мышц.

Микроскопические наблюдения над оттаявшими мышцами показали полную деструкцию волокон. Последние были мутны, лишены поперечной исчерченности и заполнены однообразной творожистой массой коагулировавшей протоплазмы. Сарколемма таких волокон, однако, оставалась неповрежденной. Мышцы, извлеченные из жидкого воздуха, при оттаивании на воздухе или в растворе Рингера всегда сильно сокращались.

Анализ полученных данных показывает, что усиление адсорбционной способности, наступающее в результате повреждения мышечной ткани замораживанием, достигает своего высшего уровня во всяком случае не позднее, чем через 5 мин. после оттаивания, и не прогрессирует далее со временем, хотя и оказывается несколько ниже уровня, который получается при фиксации мышц, например, нагреванием до 100° С. Сходный результат мы получили и в отношении токов повреждения, величина которых достигает максимума сразу же после оттаивания мышц.

Таким образом, изучение адсорбционных свойств и потенциалов повреждения показало, что характер изменений, возникающих в клет-

ке, убитой замораживанием, принципиально не отличается от изменений, вызванных в клетке высокой температурой или механическим повреждением. Следовательно, и в случае протоплазмы, убитой замораживанием, мы можем допустить, что повреждающий эффект обусловлен денатурацией протоплазматических белков. Причина же этих денатурационных изменений при замерзании воды в клетке лежит, возможно, в механическом нарушении надмолекулярных связей и молекулярных структур в результате внезапного отнятия воды.

Результаты, полученные с нитропруссидной методикой, требуют особого обсуждения.

Тогда как помутнение мышц, коагуляция ее протоплазмы и усиление адсорбционной способности указывают на происшедшие денатурационные превращения мышечных белков, сопутствуемые появлением токов повреждения, нитропруссидная реакция, на первый взгляд, противоречит этому представлению. Так, обнаружилось, что способность поврежденных замораживанием мышц к нитропруссидной реакции в первое время отсутствует, и что она возникает в заметной степени лишь через 10 мин. после оттаивания, медленно нарастает и достигает максимума только через час и позже.

В отличие от мышц, подвергшихся замораживанию, мышцы, фиксированные трихлоруксусной кислотой или нагреванием до 100°C , окрашиваются сразу с максимальной интенсивностью.

Отсутствие нитропруссидной реакции в нашем случае может быть обусловлено не только сохранением нативного состояния мышечными белками, но и неспособностью применяемых реактивов диффундировать в ткани оттаявшей после замораживания мышцы. Наблюдения, сделанные в этом направлении, подтвердили последнее предположение.

В опытах с интактными мышцами было показано, что такие мышцы, как и только что оттаявшие, не дают специфического окрашивания после обработки растворами уксуснокислого цинка и нитропруссиды натрия. В то же время мы убедились в том, что интактные мышцы, так же как и оттаявшие после замораживания, протравленные 4 мин. одним из упомянутых реактивов, быстро окрашиваются при обработке другим реактивом, если перед этой последней манипуляцией мышца нагревалась до 100°C . Эти опыты с несомненностью показывают, что и уксуснокислый цинк и нитропруссид натрия способны проникать в ткань живой или убитой замораживанием мышцы; однако они не доказывают проникновения реактивов внутрь мышечных волокон.

В последующих опытах, в которых мы механически повреждали мышечные волокна разрезами как до их замораживания, так и непосредственно вслед за их оттаиванием, мы всегда наблюдали интенсивную нитропруссидную реакцию в пограничных с разрезом участках волокон, где сарколема была повреждена. Таким образом, последние, по видимому, в наших опытах препятствовала появлению окраски. Это тем более вероятно, что трудно ожидать, чтобы разрез мог внести какие-либо другие изменения в волокне, внутренняя структура которого уже до того была резко нарушена. Таким образом, мы получили доказательство в пользу того, что вся масса мышечного волокна, подвергшегося замораживанию, содержит активные сульфгидрильные группы уже непосредственно после оттаивания. Справедливость сделанного заключения подтверждается предварительными опытами с замораживанием дрожжевых клеток. В этих опытах оказалось, что нитропруссидная реакция достигает своего максимального значения непосредственно после оттаивания клеток и совпадает с повышением адсорбционных свойств. В этом случае оболочка дрожжевых клеток, убитых замораживанием, очевидно, не препятствует проникновению реактивов внутрь клетки.

Своеобразие повреждающего действия замораживания выражается,

следовательно, в том, что проницаемость сарколеммы после оттаивания убитых замораживанием мышечных волокон увеличивается с течением времени.

К сожалению, использованная нитропруссидная реакция не дает возможности судить о наличии или отсутствии преформированных активных сульфгидрильных групп в интактных мышечных волокнах.

Таким образом, данные, полученные с помощью нитропруссидной реакции, не доказывают появления в результате замораживания активных сульфгидрильных групп в мышцах. Однако они не противоречат этой возможности и, следовательно, основному нашему выводу о денатурационных изменениях протоплазматических белков под влиянием замораживания, которые выявлены нами другими методами.

Центральный рентгенологический,
радиологический и раковый институт
Министерства Здравоохранения СССР

Поступило
31 III 1947

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Д. Н. Насонов и В. Я. Александров, Реакция живого вещества на внешние воздействия, 1940. ² А. А. Браун и М. Ф. Иванов, Арх. анат., гистол. и эмбриол., 12, 3 (1933). ³ A. Giroud et H. Bulliard, Protoplasma, 19 (1933).