

П. В. МАКАРОВ

**О ВЫЯВЛЕНИИ ПАРАНЕКРОТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ КЛЕТОК
НА ПОСТОЯННЫХ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ**

ОПЫТЫ НА *ALLIUM CERA* И *A. SATIVUM*

(Представлено академиком Л. А. Орбели 15 VI 1944)

Известно, что одними из наиболее характерных признаков паранекротического состояния клетки являются весьма характерные изменения строения и свойств ядра⁽¹⁾. Эти альтерации обнаруживались или методом витальной окраски⁽²⁾ или при помощи ультрамикроскопии⁽³⁾. На обычных гистологических препаратах картин паранекроза до сих пор наблюдать не удавалось вследствие коагулирующего действия фиксаторов. Как показали мои наблюдения, после фиксации осмиевой кислотой (OsO_4) и окраски препаратов обычными методами ядра микроскопически сохраняют строение, адекватное прижизненному. В случае повреждения клеток в них легко может быть выявлена структуризация. Следовательно, таким путем удастся «фиксировать» паранекротические изменения клеток. Это положение было установлено на материале, исключавшем возможность экспериментирования (ткани человека при раневых осложнениях). Вместе с тем экспериментальная проверка полученных данных представлялась весьма существенной. В этом плане мною и были проведены опыты на клетках эпидермиса *Allium Cera* и *A. sativum* с влиянием различных паранекротических агентов.

Методика. Участки эпидермиса с наружной вогнутой стороны чешуи лукович *Allium Cera* и *A. sativum* непосредственно или после соответствующего воздействия фиксировались 0,25% раствором OsO_4 на дистиллированной воде. К 10 см³ жидкости прибавлялись 1—2 капли 0,5% H_2O_2 для предотвращения восстановления осмия тканью. Через 24 часа кусочки промывались водой, окрашивались квасцовым кармином, гематоксилином Бёмера с эозином или обрабатывались по Фельгену, после чего обычным путем заключались в канадский бальзам. Параллельно с этим живые клетки изучались как в проходящем свете, так и в темном поле (параболоид-конденсор).

Норма. Строение нормальных ядер в значительной степени зависит от качества исходного материала. В случае соблюдения необходимых мер предосторожности после фиксации OsO_4 ядра имеют вид совершенно однородных пузырьков без следа каких-либо зернистых или сетчатых структур. В них выявляются лишь ядрышки. Обычные красители окрашивают все ядро совершенно равномерно. Результаты обработки по Фельгену свидетельствуют о том, что основная химическая компонента ядра — тимонуклеиновая кислота распределена равномерно, пропитывает ядро диффузно, не образуя

каких-либо локальных сгущений, соответствующих ядерному остову (рис. 1, *a*).

В полном соответствии с только что рассмотренной картиной находятся ультрамикроскопические данные. В темном поле ядра оптически пусты, не отличимы от черной цитоплазмы. В последней ярко сверкают броунирующие микрозомы (рис. 2, *a*). В проходящем свете ядра живых клеток также представляются гомогенными.

Иногда на поверхности ядра образуют складки, которые легко обнаруживаются как при жизни, так и на фиксированных OsO_4 препаратах.



Рис. 1. Ядро клеток эпидермиса *Allium Cera*. Фиксация 0,25% OsO_4 , обработка по Фельгену. *a* — норма; *b* — норма *A. sativum*; *c* — $N/200 \text{ CH}_3\text{COOH}$ 30 минут; *d* — $N/200 \text{ CH}_3\text{COOH}$ 30 минут, 1% глюкоза 1 час; *e* — $3m \text{ C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 30 минут; *f* — $3m \text{ C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 30 минут, 1% глюкоза 1 час; *g* — 50°C 10 минут; *h* — механическое воздействие; *i* — ультрафиолетовые лучи 10 минут; *k* — то же 5 минут; *l* — то же 5 минут, 1% глюкоза 1 час; *m* — 10% глюкоза 30 минут; *n* — 10% глюкоза 30 минут, 1% глюкоза 1 час

Надо отметить что ядра *Allium sativum* более плотны, богаче органическим материалом, чем ядра *A. Cera* (рис. 1, *b*). В остальном между ними различий нет.

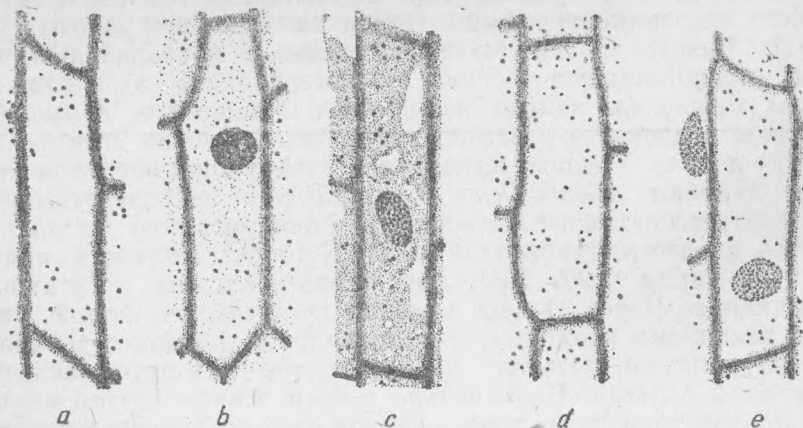


Рис. 2. Клетки эпидермиса *Allium Cera* в темном поле. *a* — норма; *b* — $N/200 \text{ CH}_3\text{COOH}$ 30 минут; *c* — $3m \text{ C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 30 минут; *d* — $3m \text{ C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 30 минут, 1% глюкоза 1 час; *e* — 10% глюкоза 30 минут

Действие уксусной кислоты (CH_3COOH). После пребывания кусочков эпидермиса *Allium Cera* и *A. sativum* в течение 30 минут в слабых растворах CH_3COOH ($N/100$ — $N/600$) и фиксации OsO_4 в ядрах окрашиваются сетчато-зернистые структуры. Варьируя концентрацию кислоты, можно получить различные степени выра-

женности этих структур. При слабом повреждении в ядрах обнаруживается зернистость, равномерно заполняющая ядро. При более значительном воздействии можно отметить слияние отдельных зерен в сетчатые образования (рис. 1, *c*). При исследовании живого материала в темном поле после воздействия CH_3COOH удается уловить сходные изменения внутреннего строения ядра (рис. 2, *b*). Оптически пустые ядра оказываются заполненными сверкающе белой зернистостью, цитоплазма слабо опалесцирует. Иными словами, наблюдаются изменения, типичные для паранекроза (³).

Рассмотренные изменения (начиная с $N/200$ CH_3COOH) обратимы. Если фиксировать OsO_4 кусочки эпидермиса, обработанные кислотой, а затем перенесенные на 1 час в чистую воду или 1% раствор глюкозы, то ядра вновь становятся гомогенными (рис. 1, *d*). Ультрамикроскопически при жизни они оптически пусты.

Влияние этилового спирта ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$). Под влиянием 3—4 *m* $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ в ядрах появляется зернистость, которая может быть с ясностью обнаружена как на препаратах после фиксации OsO_4 (рис. 1, *e*), так и при жизни ультрамикроскопически (рис. 2, *c*). В темном поле под воздействием $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ начинает опалесцировать цитоплазма, в ней появляются черные оптически пустые вакуоли, блеск микрозом ослабевает. 2*m* $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ не производит заметного изменения клеточных структур.

Повреждения, вызываемые 3*m* $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, легко репарируемы: ядра вновь и ультрамикроскопически и на постоянных препаратах приобретают гомогенный вид (рис. 1, *f* и 2, *d*). 4*m* $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ производит уже необратимые изменения.

Термические воздействия. Нагревание в течение 10 минут до 40°C не оказывает сколько-нибудь заметного влияния на клеточную структуру. Пребывание в течение того же срока при 50 и 60°C влечет за собою резкую структуризацию ядер. Образующиеся глыбки крупны, массивны. Вокруг ядрышек появляются светлые пространства (рис. 1, *g*).

В соответствии с литературными данными (⁴), добиться обратимости после термического воздействия трудно. Лишь в части клеток, подвергшихся нагреванию до 50°C , ядра возвращались в исходное бесструктурное состояние. В большинстве же случаев приходилось констатировать гибель клеток.

Механическое повреждение. Если в центре кусочка эпидермиса произвести надавливание, то в зоне воздействия все ядра на фиксированных препаратах оказываются структурированными (рис. 1, *h*). Обратимость наблюдать не удалось. Надо отметить, что разрезание клеток приводит к тому же эффекту. Этим объясняется наличие в контрольном материале, по краям кусочка, клеток со структурированными ядрами, причем изменению подвергаются не только клетки с нарушенной целлюлозной оболочкой, но и клетки, непосредственно к ним прилегающие. В части из этих клеток альтерации носят обратимый характер.

Действие ультрафиолетовых лучей. При значительных дозах УФ (кварцевая лампа 40 см от горелки, облучение 10 минут и больше) в клетках происходят изменения, сходные с теми, которые наблюдаются под влиянием термического фактора (нагревание объекта в опыте было исключено). В ядрах появляются крупные глыбки, ядрышки окружены светлыми ореолами (рис. 1, *z*). При меньших дозах (освещение 3—5 минут) можно добиться такого положения, что непосредственно после воздействия какие-либо структурные изменения не улавливаются (рис. 1, *k*). Вместе с тем, УФ уже оказывают свое действие, проявляющееся спустя некоторое время. В чистой воде или 1% глюкозе спустя 1 час ядра всех

клеток оказываются структурированными (рис. 1, *l*). Следовательно, УФ обладают последствием, производят сначала незаметные изменения, которые, прогрессируя, приводят клетки к гибели. Эти данные находятся в полном соответствии с наблюдениями Александрова (1).

Влияние гипертонии. Под воздействием гипертонических растворов (глюкоза и др.) в ядрах, фиксированных O_3O_4 , обнаруживается очень мелкая зернистость (рис. 1, *m*). Ультрамикроскопически также удается наблюдать в этих условиях появление в ядрах светящихся зерен (рис. 2, *e*). Возникающая структура бесследно исчезает после перенесения в воду или 1% глюкозу (рис. 1, *n*).

Под влиянием рассмотренных агентов в ядрах клеток происходит процесс обратимой коагуляции. Основу появляющихся структур составляют, несомненно, нуклеопротеиды. В нормальном ядре они распределены диффузно, диспергированы равномерно, при повреждении выпадают в виде зерен и глыбок. Непосредственное представление об этом процессе дает реакция Фельгена: в норме окрашивается равномерно все ядро, в паранекротическом состоянии тимонуклеиновая кислота конденсируется в сетчато-зернистые структуры. Если детально присмотреться к процессу обратимости, то можно проследить на постоянных препаратах, как по мере уменьшения числа и объема глыбок становится все более интенсивной диффузная окраска всего пространства ядра. Глыбки «хроматина» подвергаются растворению, диспергированию.

Нельзя не подчеркнуть также, что при общей монотонности реагирования ядер на повреждающие воздействия: образование в них структур — влияние каждого агента имеет свою специфику. Без труда, например, можно различить ядра, подвергавшиеся воздействию спирта или нагревания, гипертонии или кислот. Под влиянием спирта и гипертонии возникает мелкая зернистость, при чем зерна не имеют тенденции к слиянию в сети. При действии кислот легко образуются сетчато-зернистые структуры, а нагревание влечет за собой возникновение в ядрах крупных глыбок. Изменения, вызываемые спиртом, сравнительно легко обратимы, термические — преодолеваются с большим трудом, ультрафиолетовые лучи обладают несомненным последствием.

Из изложенного можно сделать следующие выводы.

1. Наблюдается полное соответствие между прижизненным строением ядер и их структурой на постоянных микроскопических препаратах после фиксации осмиевой кислотой.
2. После фиксации осмиевой кислотой на препаратах можно с большой четкостью обнаружить тончайшие изменения в строении ядер поврежденных клеток и проследить обратимость таких альтераций, иными словами, удается «фиксировать» паранекроз.
3. Ядерные структуры при повреждении возникают *de novo*. Образующиеся зерна и глыбки при репарации клетки исчезают без следа, диспергируются.
4. При общей монотонности реакции клетки на повреждение каждый из агентов обладает своей спецификой.
5. Нормальные ядра эпидермиса *Allium Cepa* и *A. sativum* обладают не мнимой, обусловленной тождеством показателей преломления отдельных ядерных компонентов, а истинной микроскопической гомогенностью.

Поступило
15 VI 1944

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Д. Насонов и В. Александров, Реакция живого вещества на внешние воздействия, изд. АН СССР, 1940. ² Д. Насонов, Z. Zellforsch., 11 (1930). ³ П. В. Макаров, Арх. анат., гист. и эмбр., 19, 1—2 (1938); 25, 1 (1940).