

ГИСТОЛОГИЯ

Е. М. БРУМБЕРГ, Е. А. МОЙСЕЕВ и А. А. ФЕРХМИН

**О ПРИМЕНЕНИИ ФИКСАТОРОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ
В КАЧЕСТВЕ „КРАСИТЕЛЕЙ“ ПРИ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ
МИКРОСКОПИИ***(Представлено академиком Л. А. Орбели 21 XII 1946)*

Большинство биологических работ, выполненных до настоящего времени с ультрафиолетовым (у.-ф.) микроскопом, посвящено изучению собственного поглощения у.-ф. лучей веществами — компонентами тканей. В связи с этим исследователи остерегались воздействовать на изучаемые объекты при предварительной обработке, необходимой для получения препарата для микроскопического исследования, реагентами, могущими изменить естественное поглощение у.-ф. лучей тканевыми элементами^(2,6). Так, в качестве фиксаторов эти авторы применяли уксусную кислоту⁽¹⁾, формалин или смесь Сапоу (алкоголь + хлороформ + уксусная кислота). Нуден считал, что фиксация не сдвигает максимума поглощения у.-ф. лучей, а лишь иногда смесь усиливает светопоглощение⁽²⁾.

Caspersson⁽⁶⁾ и его сотрудники изучали, главным образом и с наибольшим успехом, распределение в клетках нуклеиновых кислот, отличающихся весьма характерным и очень интенсивным поглощением лучей в у.-ф. части спектра в области 265—257 м μ . Однако в тех же работах авторам встречалась необходимость дифференциального изучения других компонентов с гораздо более слабым светопоглощением в у.-ф. области, например протеинов, что оказывалось более трудным в сложном комплексе клеточного тела. В этих случаях возможность избирательного усиления поглощения у.-ф. лучей элементами тканей могла бы значительно облегчить работу исследователя.

Уже первоначальные поиски наши в работе с у.-ф. микроскопом (1944 г.) показали, что обработка тканей некоторыми фиксирующими смесями, широко используемая при гистологических исследованиях, далеко не безразлична и значительно изменяет поглощение тканями у.-ф. лучей. Этот факт, сам по себе, заслуживает серьезного внимания, потому что может явиться источником ошибочной интерпретации получаемых гистологических картин, если влияние фиксатора не учитывается. В литературе известны случаи использования таких „неиндифферентных“ фиксаторов при исследовании в у.-ф. микроскопе. Так, например, Lavin, Hoagland и Shank⁽³⁾ при изучении поперечно-полосатых мышц с помощью у.-ф. микроскопа применяли предварительную фиксацию объектов в растворе Zenker'a (смесь двухромовокислого калия и сернокислого натрия с сулемой и уксусной кислотой в водном растворе), содержащем вещества, обладающие резким поглощением в у.-ф. области.

Ниже мы приводим результаты своих исследований с целью показать возможность и целесообразность применения некоторых реагентов, резко изменяющих поглощение у.-ф. лучей в тканях как „уль-

трафиолетовых красителей“, дающих способ избирательно усилить или „сдвинуть“ поглощение у.-ф. лучей тканевыми элементами и тем самым облегчить выявление их при у.-ф. микрографии.

При исследованиях мы пользовались установкой для у.-ф. микрографии, сконструированной в лаборатории акад. С. И. Вавилова, отличающейся ахроматической оптикой, дающей гораздо больше возможностей при работе в разных длинах волн в у.-ф. части спектра. Объектив $n \cdot A = 0,5$; съемка без окуляра; дополнительное увеличение $3\times$ и $7\times$. Источник света при съемках — ртутно-кварцевая лампа. Микрофотографирование производилось в длинах волн: 250—280 μ (фильтры — газообразный хлор + газообразный бром + correx), 313 μ (хромовокислый калий + correx) и 365 μ (ФС2 + correx). Все съемки производились при одинаковых экспозициях для одной и той же длины волны. Фотографируемые срезы одинаковой толщины (2 μ) заключались между кварцевыми пластинками в жидкое вазелиновое масло или в смесь глицерина с водой. Все исследуемые срезы никакими красками не подкрашивались и в видимом свете под микроскопом были в большинстве с трудом различимы, либо только контурировались.

Выбор для тканей фиксаторов, которые не изменяли бы „естественного“ поглощения тканями в у.-ф. области, требует большой осторожности. Neuroth и Loofbourow⁽⁴⁾ обнаружили значительные изменения в поглощении после облучения у.-ф. лучами веществ, содержащих пиримидиновые кольца. Исследуя распределение тимонуклеиновой кислоты в хромосомах, Caspersson⁽¹⁾ уделил специальное внимание этому вопросу и пришел к заключению, что время, необходимое для проведения исследования в у.-ф. лучах, недостаточно для того, чтобы вызвать изменения поглощения. Абсорбционная картина живой клетки не отличается в существенном от таковой в клетках, фиксированных уксусной кислотой, замораживанием и высушиванием по Gersh'y, и лишь несколько усиливается после фиксации по Carnoy.

Недавно один из нас наблюдал при исследовании культур тканей *in vitro*, что светопоглощение в у.-ф. области резко усиливается по мере умирания клеток⁽⁵⁾. Контролем служила реакция клеток на окрашивание нейтральрот.

Поэтому, говоря об „индифферентных“ фиксаторах, мы подразумеваем такие фиксаторы, которые не вносят изменений светопоглощения мертвых, убитых тканей в у.-ф. лучах. Подобную категорию фиксаторов иллюстрируют репродукции микрофотограмм (рис. 1, *a* и *b*), снятых со срезов, фиксированных смесью Carnoy (*a*) и алкоголем (*b*). К сожалению, по техническим причинам мы не могли использовать метод Gersh'a. Объект — срез спинального ганглия кролика. На рис. *a* видна картина распределения светопоглощения в ткани, известная в литературе^(2,6,7). Снимки, сделанные в волнах 313 и 365 μ , показывают, что избирательное светопоглощение тканевыми элементами, отчетливо выступающее в области 250—280 μ , резко падает в длинноволновой у.-ф. области.

Однако применение других фиксаторов и некоторых реагентов, употребляемых в гистологии в качестве „протрав“ перед окрасками, показывает, что светопоглощение тканевых элементов в у.-ф. лучах удается довольно легко изменить — „окрасить“ ткань в у.-ф. При этом легко можно выбрать способы избирательной „окраски“ препарата.

На рис. 1, *c*, *d*, *e* и *f* приведена серия микрофотографий спинального ганглия кролика, снятых со срезов, фиксированных смесями, изменяющими поглощение у.-ф. лучей тканями.

При рассмотрении микрофотограмм можно отметить, что они довольно резко разделяются на три характерных категории.

* Рис. 1 см. на вклейке.

1. Рис. 1, *c*, изображающий микрофотограмму среза спинального ганглия кролика, фиксированного в смеси Hürthle (двуххромовоокислый калий, серноокислый натрий, сулема, ледяная уксусная кислота и формалин), снятого при $\lambda = 250-280 \text{ м}\mu$, показывает значительное увеличение поглощения у.-ф. лучей клеточным телом; кроме того, ясно выступают нервные волокна за счет ясного повышения абсорбции ими у.-ф. лучей. В данном примере мы имеем случай, где фиксация повлекла за собою „окрашивание“ в у.-ф. области тканевых элементов, не обладающих естественным поглощением в у.-ф.

Характерным для этой группы было еще то, что поглощение лучей тканями в других длинах волн оставалось без изменений.

2. На рис. 1, *d* — микрофотограмма, снятая с того же объекта, фиксированного в смеси Voip (пикриновая кислота, ледяная уксусная кислота и формалин). При сравнении снимков отмечается очень малое различие между поглощением у.-ф. лучей тканевыми элементами во всех трех использованных нами областях спектра ($\lambda = 250-280$, 313 и 365 $\text{м}\mu$). На рисунке приведена фотография, снятая при $\lambda = 360 \text{ м}\mu$. Эта группа фиксаторов характеризуется передвижением области интенсивного поглощения лучей, расширением ее в длинноволновую сторону. Срезы, из которых пикриновая кислота удалялась тщательным промыванием в дистиллированной воде, теряли описанные характерные особенности этой группы.

3. Наконец, на рис. 1, *e* и *f* показаны микрофотограммы с препаратов, фиксированных по способу Champy (осмиевая кислота + двуххромовоокислый калий) в течение короткого времени (не более 2 час. для целого спинального ганглия кролика). Репродукция снимка при $\lambda = 250-280 \text{ м}\mu$ показывает очень сильное повышение светопоглощения и „окрашивание“ тканевых структур, подобное описанному выше в п. 1, но гораздо более интенсивное. При сличении с ней снимков, сделанных при $\lambda = 313$ и 365 $\text{м}\mu$, оказывается, что нервные волокна сохраняют интенсивное поглощение, выступающее избирательно, тогда как светопоглощение нервными клетками при переходе в длинноволновую область резко падает. На рис. 1, *f* дан снимок при $\lambda = 365 \text{ м}\mu$.

Избирательное поглощение лучей в у.-ф. области для большинства веществ в тканях наиболее значительно на участке $\lambda = 280-250 \text{ м}\mu$. Поэтому имеются серьезные трудности при необходимости дифференцировать отдельные тканевые компоненты, плохо различимые из-за схождения между собой спектральных кривых поглощения в у.-ф. области. Применение различных фиксаторов (или специальных протрав) при предварительной подготовке объектов для исследования позволяет при помощи несложных манипуляций избирательно „сместить“ максимум поглощения у.-ф. лучей отдельными тканевыми элементами и, тем самым, выявить их в другой области, где они менее маскируются соседними компонентами тканей.

В заключение мы выражаем глубокую благодарность акад. С. И. Вавилову за любезное разрешение провести эту работу в его лаборатории и постоянное внимание к ней.

Государственный оптический институт и
Институт эволюционной физиологии и патологии
высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова

Поступило
21 XII 1946

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ T. Caspersson, *Naturwissenschaften*, **23**, 500 (1935). ² H. Hydén, *Acta physiol. Scand.*, **6**, Suppl. 17 (1943). ³ Ch. L. Hoagland, B. E. Shank and G. T. Lavin, *J. Exp. Med.*, **80**, 9 (1944). ⁴ F. Heyroth and J. Loofbougow, *J. Am. Chem. Soc.*, **53**, 341 (1:31) (цит. по Caspersson'у). ⁵ Л. Ф. Ларонов и Е. М. Брумберг, *ДАН*, **154**, 267 (1946). ⁶ T. Caspersson, *Skand. Arch. f. Physiol., Suppl.* 8 (1936). ⁷ I. Gersh. and D. Bodian, *Biolog. Symposia*, **10**, 163 (1943).