

Б. В. КЕДРОВСКИЙ и К. П. ТРУХАЧЕВА

## НОВЫЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ МОРФОЛОГИИ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

(Представлено академиком А. И. Абрикосовым 26 VII 1952)

### 1. Метод определения структурной плотности

Современный анализ гистологических структур не довольствуется описанием соотношения элементов и их происхождения друг от друга, но одновременно стремится выяснить их значение в клеточной функции и в тканевом обмене веществ. Необходимым условием для выполнения этих задач является знание физики, химии и физической химии всех морфологически обнаружимых и реально существующих частей клеточного содержимого и межклеточных структур. В этом направлении ведутся обширные исследования живых и фиксированных тканей; но некоторые свойства структур остаются до сих пор вне внимания. К таким свойствам относится степень относительной плотности желеобразных компонентов различных клеток и образуемых ими волокнистых структур.

Еще М. Гейденгайном было указано, что одним из критериев относительной плотности может служить метод окрашивания железным гематоксилином. Согласно еще слабо разработанной теории этого метода, частицы красителя образуют внутри структур окрашенное в черный цвет соединение с молекулами железно-аммиачных квасцов, предварительно адсорбированными на тканях. При последующей дифференцировке образовавшиеся частицы лака извлекаются с наименьшей скоростью из наиболее плотных (мелкопористых) элементов. Было, однако, замечено (1, 2), что гематоксилин окрашивает при этом некоторые структуры и как основная краска, т. е. согласно химической (или электрохимической) теории окрашивания, и поэтому прочно удерживается также в элементах с кислотными свойствами. Окрашивание гематоксилином Гейденгайна хроматина, хромосом, базофильных элементов цитоплазмы, основного вещества хряща и т. д. зависит, несомненно, и от их химизма и от их относительной плотности. Оба механизма окрашивания не всегда удается расчленивать.

Другой принцип определения плотности основан на законе зависимости скорости диффузии молекул в водных растворах и желях от их размеров: меньшие частицы диффундируют с большей скоростью. Применимость этого закона по крайней мере к механизму окрашивания кислотными красителями доказана в работах, выполненных в лаборатории Меллендорфа. При окрашивании срезов в смеси двух кислотных красителей с различной средней величиной частиц мелкодисперсные красители окрашивают относительно более плотные (мелкопористые), крупнодисперсные — менее плотные структуры. Но механизм окрашивания осложняется некоторыми побочными факторами. В результате их анализа на основе данных

литературы и собственного опыта нами было выяснено, что конечный результат зависит от следующих основных причин.

1. От абсолютной средней величины частиц каждой краски в растворе и от разницы в значении абсолютных величин размеров. Для крупных частиц есть предел плотности структуры, выше которого они в данную структуру не проникают, а адсорбируются только на ее поверхности.

2. От концентрации красителей в растворе и, особенно, от соотношения этих концентраций. Так как скорость диффузии зависит от величины градиента диффузии, то из более концентрированного раствора проникновение красителя внутрь структуры будет происходить скорее. В структурах средней плотности должна возникнуть своеобразная конкуренция за заполнение пор между частицами обоих красителей. Краситель, присутствующий в более высокой концентрации, будет обладать преимуществом по сравнению с другим.

3. От прочности связывания красителей в субстрате, которая, в свою очередь, зависит от соотношения зарядов частиц красителя и субстрата. Это соотношение определяется химической природой того и другого и активной реакцией раствора. В многочисленных работах было показано, что кислые красители красят интенсивней с повышением концентрации водородных ионов в растворе. Некоторое значение имеет и величина частиц. На крупнопористых элементах высокодисперсные красители по неясной причине адсорбируются с трудом или вообще не адсорбируются (3).

4. От фактора интенсивности цвета красителя, который, например, у метилового голубого выше, чем у оранжевого.

5. От последующей дифференцировки окрашенного препарата, при которой высокодисперсные красители покидают окрашенные структуры быстрее, чем низкодисперсные.

Для разработки метода мы выбрали 2 сульфокраски: метиловый голубой (мол. вес около 800) и оранжевый Г (мол. вес 452, 4). По своей химической природе метиловый голубой относится к группе розанилинов (из трифенилметановых красителей), оранжевый — к группе азокрасок. Метиловый голубой содержит 3 сульфогруппы, оранжевый — 2 сульфогруппы в молекуле. Судя по данным литературы (4, 5), средний диаметр частицы у первого красителя в разбавленных растворах по крайней мере в 5—6 раз больше, чем у второго. Степень дисперсности того же красителя несколько возрастает при разбавлении раствора от 0,1% до 0,03%, а также при его старении в течение первых 5 дней после приготовления (через 5 дней приблизительно на 40%). Относительно оранжевого аналогичные данные мне неизвестны.

Следующий способ окраски может считаться стандартным:

1. Окрашивать 20—40 мин. в следующей смеси:  
0,1% водного раствора метилового голубого . . . . . 1 часть  
1% водного раствора оранжевого Г . . . . . 10 частей  
80% уксусной кислоты . . . . . 8—10 капель на 100 мл\*.

2. Дифференцировать в 96° спирте с контролем под микроскопом.

3. Абсолютный спирт, ксилол, бальзам.

Результат: хроматин и коллаген синие (первый частично зеленый и желтый), цитоплазма синяя или, чаще, зеленая, ядрышки и эритроциты желтые. Желтыми оказываются также участки, излишне обезвоженные при обработке материала.

Структуры возрастающей плотности окрашиваются соответственно следующей шкале цветов:

синий — зеленый — желто-зеленый — желтый — оранжевый.

Наибольшие трудности в различении оттенков обнаруживают участки средней структурной плотности, т. е. те, которые окрашиваются в зе-

\* Подкисление раствора необходимо для усиления окрашиваемости структур средней плотности оранжевым Г.

ленный цвет разных оттенков. Предложенный нами метод достигает здесь предела своей чувствительности. В случае неясной картины можно видоизменить условия окрашивания, имея в виду теоретические основы метода, изложенные выше. Если желательно усилить синие тона, следует увеличить срок окрашивания с тем, чтобы метиловый голубой успел проникнуть в более плотные структуры и вытеснить из них другую краску. Того же результата можно достигнуть, повышая его концентрацию в красочной смеси. Обратные приемы приведут к усилению зеленых и желтых тонов в препарате. Таким путем различия в плотности между испытуемыми структурами иногда удается сделать более резкими.

Влияние разных фиксаторов на результат окраски, видимо, невелико. Хорошие результаты дают фиксаторы Ценкера и Сан-Феличе.

Описанный нами метод не является оригинальным по замыслу. Способы окраски по Унна (смесью нигрозина с оранжевым) и по Манну или Меллендорффу (смесью метилового голубого с эозином) основаны как раз на этом принципе различения структур по плотности\* и в отдельных случаях были применены именно с такою целью<sup>(6)</sup>. Однако, все эти методы или более сложны и прихотливы, или менее свободны от теоретических возражений, или менее экономны. В общем, все они позволяют обнаружить путем дифференциальной окраски такие структуры, которые при других методах остаются неразличимыми. В этом состоит их значение в морфологических исследованиях. Их значение для физиологии клетки основывается прежде всего на том, что в интенсивно работающей клетке в более плотных структурах (или на их поверхности) создаются более благоприятные условия для синтезов, идущих с освобождением частиц воды. Этот вывод не следует, впрочем, переоценивать или понимать его в обратном смысле.

Некоторые из результатов, полученных нами и другими авторами, уже могут быть обобщены и заслуживают известного внимания.

1. Ядрышки всех исследованных тканей отличаются более высокой плотностью, чем хроматин, основная масса цитоплазмы и большинство фибриллярных структур. О высокой плотности ядрышек свидетельствует также результат окрашивания железным гематоксилином, а также испытание их плотности с помощью физических методов изучения живых и фиксированных клеток (центрифугирование, микроманипуляция, спектрография)\*\*.

2. Степень структурной плотности не стоит в прямой связи ни с формой коллоидных молекул, ни, повидимому, со степенью их полимеризации. По сравнению с корпускулярными белками эритроцитов фибриллярные белки мышц отличаются меньшей плотностью. Еще более рыхлое строение обнаруживают пучки коллагена. Такого рода наблюдения были описаны уже раньше.

3. Материал нейрокератиновой сети миэлиновых волокон после фиксации 96° спиртом оказывается значительно более плотным, чем субстрат осевого цилиндра. Блок<sup>(7)</sup>, изучая химический состав мозга млекопитающих, выделил трудно растворимый и трудно перевариваемый «нейрокератин», который он предположительно отождествил с субстратом нейروفибриллей. На основе анализа плотности миэлиновых волокон, а также старых данных о химической резистентности их частей, найденный Блоком белок скорей следует сопоставить с гистологическим субстратом, описанным под тем же названием, т. е. с упомянутой выше нейрокератиновой сетью.

\* Принцип этот важней частного метода. Вероятно, можно составить такие же красочные смеси из разных пар красителей высокой (ауранция, пикриновая кислота, трипофлавин) и низкой (нигрозин, пирроловый, анилиновый, трипановый и щелочной голубые) дисперсности. Пирроловый голубой и оранжевый особенно сильно различаются по средней величине частиц.

\*\* Таких данных в литературе уже достаточно много для обоснования общего вывода о плотности ядрышка.

## 2. Обнаружение остатка триптофана в составе белка на гистологических препаратах

Среди гистохимических реакций, предложенных для обнаружения в составе белков остатков различных аминокислот, наименьшим успехом пользуются реакции, служащие для открытия триптофана. В ряде работ нам оказал услуги метод открытия этой аминокислоты с помощью известной в химии белка реакции с парадиметиламинобензальдегидом (реактив Эрлиха). Однако и этот метод не обратил на себя внимания, отчасти, быть может, потому, что не был опубликован отдельно.

Триптофан, являющийся по своей природе индолаланином, содержит в своей молекуле гетероциклическое кольцо индола, от которого и зависит его цветная реакция с альдегидом Эрлиха. Ту же реакцию дают и другие производные индола. Чувствительность ее высока (1:1 000 000). В основу ее гистохимического варианта были положены работы Роде (8). Гистохимический метод состоит в следующем.

Материал, фиксированный в спирте, сулеме или спирте с формалином, заливается в желатину; желатиновые блоки, если надо, фиксируются в слабом растворе формалина (который затем отмывается в проточной воде) и разлагаются на возможно более тонкие срезы. Желатина, не содержащая триптофана, остается после реакции бесцветной и служит хорошим контролем метода.

Срезы последовательно помещаются в следующие реактивы:

1. В 5% раствор альдегида Эрлиха в 10% серной кислоте \* на 5 мин.
2. В концентрированную серную кислоту на  $\frac{1}{2}$ —1 мин. до пожелтения срезов.
3. В дистиллированную воду или в новую порцию реактива. Участки, содержащие гистохимически обнаружимый триптофан, принимают красную или фиолетовую окраску.

После короткого промывания в дистиллированной воде срезы рассматриваются в глицерине.

Парафиновые срезы дают худшие результаты, отчасти потому, что срезы отстают от стекол. Постоянных препаратов получить не удалось.

Триптофан открывается в клеточной цитоплазме и особенно в белковых включениях, изредка в ядрышке, и ни разу не был обнаружен в составе ядерного хроматина.

Институт морфологии животных  
им. А. Н. Северцова  
Академии наук СССР

Поступило  
28 I 1952

### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> K. Zeiger, Z. f. Zellforsch., 20, No. 1, 1 (1934). <sup>2</sup> K. Zeiger, Physikochemische Grundlagen der histologischen Methodik, Dresden und Leipzig, 1938. <sup>3</sup> A. Czaja, Planta, 11, No. 3, 582 (1930). <sup>4</sup> M. Seki, Fol. anat. Jap., 10, 621 (1932). <sup>5</sup> A. Nistler, Kolloidchem. Beih., 31, No. 1, 1 (1930). <sup>6</sup> E. Wermel, Z. f. Zellforsch., 4, No. 2, 227 (1926). <sup>7</sup> R. Block, Cold Spr. Harb. Symp., 6, 79 (1938). <sup>8</sup> E. Rohde, Hoppe-Seylers Z., 44, 171 (1905).

\* Реактив пригоден для употребления в течение 2—3 недель.



Рис. 1. Средняя оболочка пупочной вены зародыша 4 месяцев. Мышечные волокна перекрашены. Между ними пузырьки. Ц-ф. Жел. гемат. Микрофото.  $\times 900$

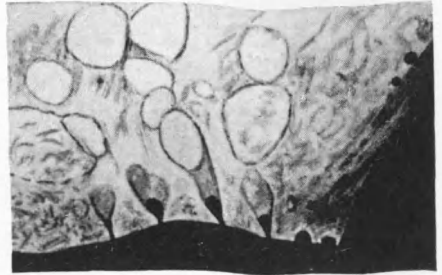


Рис. 2. Средняя оболочка пупочной артерии новорожденного ребенка. Образование пузырьков и отделение их от гладкомышечной клетки. Ц-ф. Жел. гемат. Рисунок.  $\times 1170$



Рис. 3. Средняя оболочка пупочной вены зародыша 8 месяцев. Образование пузырьков гладкомышечными клетками. Ц-ф. Жел. гемат. Микрофото.  $\times 900$

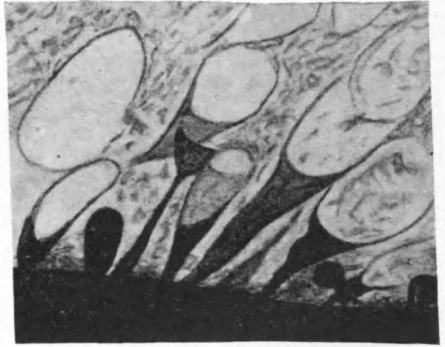


Рис. 4. Средняя оболочка пупочной вены зародыша 8 месяцев. Отделение пузырей от гладкомышечной клетки. Ц-ф. Жел. гемат. Рисунок.  $\times 1170$