

Е. М. БРУМБЕРГ, М. П. БУХМАН и В. Е. КОЗЛОВ

ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ДЛЯ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

(Представлено академиком А. И. Опариным 15 VII 1952)

Быстрому развитию гистохимии и гистофизиологии препятствует ограниченность средств определения, хотя бы качественного, веществ, содержащихся в отдельных клетках и тканях изучаемых биологических объектов в микроскопически малых количествах.

Некоторые новые возможности в гистохимическом анализе дает ультрафиолетовая микроскопия с ее цветовым (¹⁻³) и спектроскопическим (^{4, 5}) приемами изучения химии препаратов.

В иностранных работах, посвященных ультрафиолетовой микроскопии, выполненных до настоящего времени, авторы стремились сохранить естественное поглощение препаратом ультрафиолетовых лучей в неискаженном виде, поскольку это вообще возможно для препаратов, приготовленных из материала фиксированного и, следовательно, обработанного химическими реактивами. Однако использование лишь естественного поглощения препарата чрезвычайно ограничивает возможности ультрафиолетовой микроскопии, так как поглощение многих веществ либо не достаточно характерно (отлогие границы полос поглощения, малые коэффициенты поглощения), либо расположено в далекой коротковолновой области спектра, неудобной для наблюдений. Кроме того, приходится считаться с тем обстоятельством, что возможных цветовых оттенков, различаемых глазом, имеется значительно меньше, чем различных химических соединений, число которых даже в одном препарате может быть велико; то же можно сказать о ходе спектральных кривых поглощения. Это приводит к частому совпадению «ультрафиолетового цвета» разных веществ и не дает возможности построить, основываясь лишь на наблюдении видимого или ультрафиолетового цвета веществ, достаточно серьезную систему микрохимического анализа. Именно этим объясняется то обстоятельство, что подавляющее большинство гистологических работ, выполненных с ультрафиолетовым микроскопом, посвящено определению локализации в клетках лишь одной, правда, очень важной, группы веществ — нуклеиновых кислот и их соединений с белками, отличающихся наиболее характерными спектрами поглощения в ультрафиолетовой области спектра. Однако и этим способом до сих пор не удается уверенно дифференцировать в препаратах окси- и дезоксирибонуклеиновые кислоты и нуклеопротеиды.

Уже в первых наших работах (⁶⁻⁸) было предложено, не ограничиваясь наблюдением собственного «ультрафиолетового цвета» препаратов, производить на них прямые микрохимические реакции на отдельные вещества, действуя на препарат реактивами или ультрафиолетовыми лучами. Возможности такой ультрафиолетовой микрохимии, как показывает

простое рассмотрение вопроса, значительно шире, чем возможности обычной микрохимии, основанной на наблюдениях в видимом свете.

В настоящей статье мы иллюстрируем сказанное одним примером цветной реакции, наблюдаемой в ультрафиолетовых лучах*, а также рассматриваем некоторые другие возможности микрохимического анализа с помощью аппаратуры, предназначенной для цветной микрофотографии в условных цветах.

1. Применение метода цветовой трансформации

Ксантопротеиновая реакция. На рис. 1а, б и в приведены микрофотографии двух срезов семени растения чистотела (*Chelidonium majus* L.), полученные с помощью ультрафиолетового микроскопа в видимых и ультрафиолетовых лучах до и после проведения на препарате микрохимической реакции. На рис. 1а приведена серая фотография среза в видимом свете; она передает вид препарата таким, как он виден в микроскоп в обычных условиях. На рис. 1б тот же срез, снятый в ультрафиолетовых лучах методом цветовой трансформации. Условия съемки на рис. 1б и в следующие: фотографирование в лучах λ 365, 313 и 280—250 м μ ; светофильтры на хромоскопе соответственно: красный, зеленый и синий. Участок семядоли и белковый нарост на семени чистотела имеют на этом снимке разную окраску, соответствующую различию в их химическом составе. Микрофотография 1в получена в тех же условиях съемки с такого же среза, на котором предварительно была проведена ксантопротеиновая реакция. Отличие от обычной ксантопротеиновой реакции, приводящей к окрашиванию всего среза в оранжевый цвет, состояло в том, что в данном случае была применена не концентрированная, как обычно, а сильно разбавленная азотная кислота. Препарат обработан 1% азотной кислотой при слабом нагревании и затем раствором аммиака. В таком виде эта реакция не дает заметного окрашивания препарата в видимом свете. В отличие от обычных условий, слабая азотная кислота не сжигает и не разрушает тонких структур биологических препаратов.

Для выяснения того, присутствию какого вещества обязана зеленая окраска последнего цветного снимка, Р. И. Плотниковым и С. И. Рыскиной была проведена та же реакция в водных растворах чистых веществ, присутствие которых предполагалось в препарате. Испытанию подверглись ароматические аминокислоты — тирозин, триптофан и фенилаланин, а также одна из алифатических аминокислот — гистидин, хотя из общих химических соображений заранее было ясно, что неароматические аминокислоты не могут участвовать в данной реакции. Эти опыты, более полное описание которых будет дано в другом месте, сводились к изучению спектров поглощения растворов соответствующих аминокислот до и после проведения в них ксантопротеиновой реакции в указанном выше мягком режиме. Изменения были обнаружены лишь в спектре поглощения тирозина. Сравнением полученных спектрограмм с цветными микрофотографиями было установлено, что появление зеленой окраски на второй из этих микрофотографий обязано наличию в соответствующем месте препарата аминокислоты тирозина**.

* Эта реакция и приведенные здесь цветные иллюстрации к ней демонстрировались нами в числе других примеров ультрафиолетовых микрохимических реакций в докладе, прочитанном на Общем собрании Академии наук СССР в 1946 году (6).

** Концентрированная азотная кислота разрушает все ароматические аминокислоты до тринитрофенола. Слабая кислота не в состоянии произвести такого разрушения. Лишь один тирозин способен в этих условиях присоединить одну нитрогруппу, превращаясь при этом в мононитропроизводное. Таким образом эта реакция является специфической реакцией на тирозин. Она может наблюдаться, однако, только в лучах ультрафиолетовой области спектра.

2. Применение метода цветового сравнения

Ранее одним из нас (9, 10) был предложен прием для наблюдения химических и фотохимических превращений, происходящих в препарате под действием соответствующих реактивов или радиации. Этот прием сводится к сравнению с помощью хромоскопа двух или трех снимков с одного и того же места препарата, снятых в лучах одной и той же длины волны до и после обработки препарата реактивами или лучами, способными вызвать в нем химические превращения. Этот прием, основанный на использовании аппаратуры, предназначенной для ультрафиолетовой микроскопии по методу цветовой трансформации, открывает новые возможности для проведения под микроскопом цветных микрохимических реакций в условных цветах. В отличие от спектральной цветовой трансформации, рассмотренной выше, он может быть назван «методом цветового сравнения». Поясним сущность этого метода примером определения локализации дрожжевой нуклеиновой кислоты в клетках пыльника лилии (*Lilium bulbiferum* L.).

На рис. 2б и 2в приведены две микрофотографии участка среза пыльцевого мешка лилии, полученные в лучах с длиной волны 280—250 м μ до и после обработки препарата рибонуклеазой, способствующей растворению рибонуклеиновой кислоты. На цветной микрофотографии 2а, полученной сличением снимков 2б и 2в на хромоскопе под красным и зеленым светофильтрами, рибонуклеиновая кислота, содержание которой в препарате изменилось в результате его обработки, отчетливо выявлена зеленой окраской (деоксирибонуклеиновая кислота осталась черной).

Цитоплазма среза, обработанного рибонуклеазой, в отличие от цитоплазмы контрольных препаратов, совершенно не окрашивается красителем пиронином, что по Браше служит доказательством отсутствия в срезе рибонуклеиновой кислоты. Однако снимок, сделанный с такого препарата в лучах с $\lambda = 280\text{—}250$ м μ (рис. 2в), показывает, что поглощение препаратом этих лучей хотя и существенно уменьшается после действия фермента, но не исчезает совсем. Возможно, что это остаточное поглощение обусловлено рибонуклеиновой кислотой, прочно связанной с белками и потерявшей вследствие этого свои базофильные свойства и способность к ферментативному перевариванию рибонуклеазой*. Для доказательства этого предположения должны быть поставлены отдельные опыты.

Описанный способ цветной фотографии отмечает цветом лишь различия в почернении сравниваемых снимков и, следовательно, лишь изменение, происшедшее в препарате. Такое изменение поглощения отдельных мест препарата может быть вызвано не только удалением из него отдельных веществ избирательно действующим растворителем, но и путем получения в соответствующих местах препарата новых соединений с уменьшенным или повышенным поглощением по сравнению с исходным. Однако возможность получения цветной характеристики вещества не путем превращения его в новое соединение с характерным спектром поглощения в видимой или ультрафиолетовой области спектра (задача во многих случаях очень не простая), а простым удалением его из препарата, представляется наиболее интересной, так как она дает некоторую новую возможность исследования химического состава клеток и тканей.

Фотографирование должно производиться в лучах с длиной волны, соответствующей тем участкам в спектрах поглощения определяемых веществ, которые претерпевают наибольшие изменения в результате примененного воздействия на препарат; у большинства веществ такие участки находятся в ультрафиолетовой области спектра. Растворитель

* В. С. Шапотом и М. В. Павловой было *in vitro* доказано наличие в животных тканях рибонуклеиновой кислоты, прочно связанной с белком и не переваривающейся рибонуклеазой.

может удалять из препарата, кроме определяемых веществ, также и другие вещества, не поглощающие лучи, в которых производится фотографирование, но он не должен растворять другие вещества, поглощающие эти лучи*.

Подобным же образом при определении локализации в препарате нескольких разных веществ можно произвести сравнение на хромоскопе трех серых снимков, подвергая препарат перед третьим снимком новому воздействию, или делая два снимка в лучах разных длин волн и действуя на препарат лишь перед третьим снимком с целью отличить вещество, которое не удалось отчетливо выявить применением спектральной цветовой трансформации.

Применению метода цветового сравнения могут препятствовать деформации, происходящие в препарате при его химической обработке между первой и последующими съемками. Сильные деформации, особенно при работе с большими увеличениями микроскопа, могут сделать такое сравнение вообще невозможным, а слабые вызовут появление цветных каемок вокруг деталей препарата, изменивших свои размеры. Малые деформации не очень сильно мешают проведению химических исследований, так как по виду цветной картины, наблюдаемой в хромоскопе, обычно можно легко судить о том, имеем ли мы дело только с деформацией препарата в чистом виде или же, кроме нее, имеет место изменение поглощения некоторых деталей препарата по всему их объему. Во всяком случае, при использовании метода цветового сравнения для гистохимических целей необходимо озаботиться о том, чтобы препарат был хорошо приклеен к предметному стеклу и чтобы проводимые на нем реакции не вызывали значительных деформаций его деталей.

Авторы с глубокой благодарностью отмечают внимание к этой работе со стороны покойного акад. С. И. Вавилова, под руководством которого выполнялись все наши работы по ультрафиолетовой микроскопии.

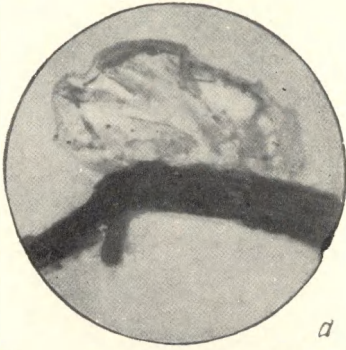
Ленинградский государственный университет
им. А. А. Жданова

Поступило
22 XII 1951

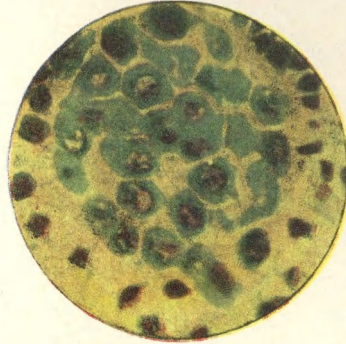
ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Е. М. Брумберг, ДАН, 25, 473 (1939). ² Е. М. Брумберг, Изв. АН СССР, сер. физ., 6, 32 (1942). ³ Е. М. Брумберг, ДАН, 52, 503 (1946). ⁴ Е. М. Брумберг, Ф. М. Пекерман, Изв. АН СССР, сер. физ., 13, 218 (1949). ⁵ Е. А. Моисеев, А. А. Ферхмин, Тр. физиологич. ин-та им. И. П. Павлова, 3, 42 (1949). ⁶ Е. М. Брумберг, Вестн. АН СССР, 6, № 8—9, 117 (1946). ⁷ Е. М. Bрумberg, Nature, 152, 357 (1943). ⁸ Е. М. Брумберг, Е. А. Моисеев, А. А. Ферхмин, ДАН, 56, 529 (1947). ⁹ Е. М. Брумберг, ДАН, 51, 591 (1946). ¹⁰ Е. М. Брумберг, Г. А. Зайцев, Т. Г. Порохова, ДАН, 73, 1165 (1950).

* В отдельных случаях можно допустить одновременное растворение двух или даже трех веществ, если скорость растворения этих веществ сильно различна.



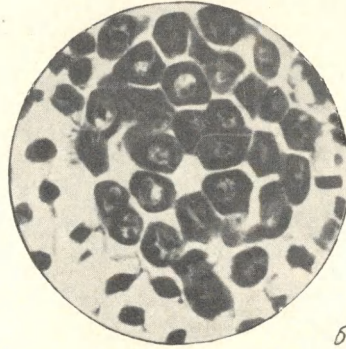
a



a



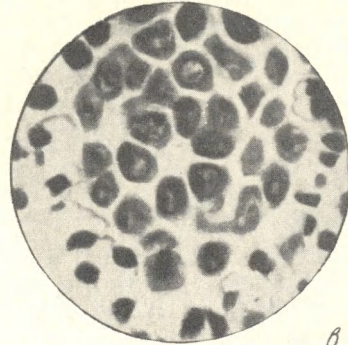
б



б



в



в

Рис. 1

Рис. 2