

А. Н. ТРИФОНОВА

**СВЯЗЫВАНИЕ КРАСИТЕЛЯ ФИКСИРОВАННОЙ МЫШЦЕЙ
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЕЕ ПРИЖИЗНЕННОГО СОСТОЯНИЯ**

(Представлено академиком А. И. Абрикосовым 24 IV 1952)

Показателем изменений, возникающих в живом веществе при повреждающих воздействиях, является усиленное связывание им прижизненных красителей. Согласно «денатурационной теории повреждения», сущность повреждения живого вещества состоит в изменении белковых молекул денатурационного типа ⁽¹⁾. Согласно нашим данным, различие в окраске нормальной и поврежденной ткани может сохраняться после ее фиксации денатурирующими фиксаторами (Карнуа и Хелли) ⁽²⁻⁴⁾.

В настоящей работе в качестве объекта нами взяты икроножные и портняжные мышцы зимних лягушек. В каждом опыте отпрепарированные парные мышцы лягушек находились в течение часа в растворе Рингера при комнатной температуре, и затем одна из них помещалась на различные сроки в нагретый раствор Рингера. Первая серия опытов проводилась при температуре 33—34°. В 5 опытах этой серии отпрепарировались 6 пар мышц и из каждой пары одна служила контролем, другая подвергалась действию температуры в течение различного времени (10, 30 мин., 1, 2, 3, 4, 5 час.). Затем опытные и контрольные мышцы фиксировались ценкер-формолом, после чего происходила обычным путем заливка в парафин и разложение на срезы, и на одно стекло наклеивались одинаковой толщины срезы всех сравниваемых мышц. После этого срезы окрашивались различными основными красителями (пиронин, толуидиновая синька, метиленовая зелень и двойная окраска: пиронин-метиленовая зелень). В пяти опытах этой серии получены хорошо совпадающие результаты, а именно, 10-минутное нахождение при этой температуре не отражается совсем на последующей окраске фиксированных мышц. Оба следующие срока воздействия (30 и 60 мин.) дают резкое ослабление окраски, а после более длительного нахождения при этой температуре (2, 3, 4, часа) наблюдается, наоборот, очень отчетливое усиление окрашиваемости (см. рис. 1). Обычно после 3- и 4-часового воздействия сильно возрастает порог электрической возбудимости, а после 5-часового нахождения при этой температуре мышца уже совсем не отвечает на электрическое раздражение, и всегда такая погибшая уже во время воздействия и затем зафиксированная мышца красителя значительно слабее парной ей мышцы, зафиксированной без предварительного воздействия. На срезах через погибшие до фиксации мышцы виден выход из мышечных фибрилл базофильных веществ. То же наблюдалось нами при окраске срезов плавательной перепонки лягушки, фиксированной после необратимого повреждения высокой температурой ⁽³⁾, и Л. Ф. Ларионовым — при повреждении клеток ультрафиолетовыми лучами ⁽⁵⁾.

Во второй серии опытов нами взята более высокая температура, 37°, и в связи с этим значительно меньшие сроки воздействия (5, 10, 15, 20 и 25 мин.). Мышцы фиксировались ценкером, видоизмененным Кедровским, и нейтральным 20% формалином. После фиксации ценкером проводилась суточная промывка, иодирование, затем иод тщательно отмывался в спирту и после 15-минутного споласкивания в дистиллированной воде мышцы целиком окрашивались в течение 1 часа, а в отдельных опытах в течение 3 и 6 час. Окраска производилась двумя основными красителями — метиленовой зеленой и нейтральной красной. Затем краска вытягивалась подкисленным спиртом и полученные вытяжки ко-

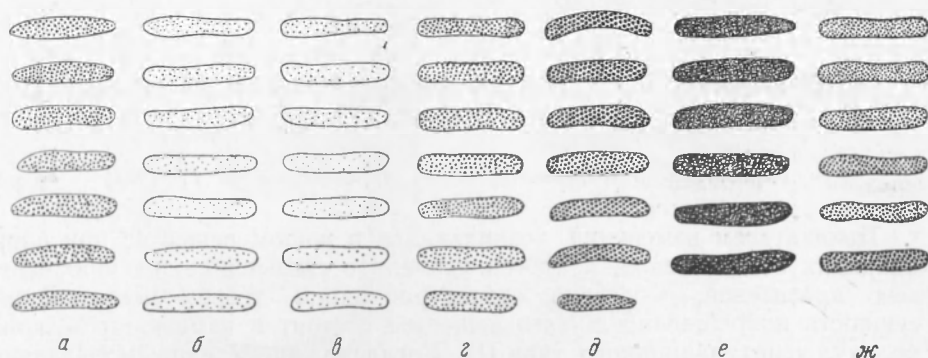


Рис. 1. Дифференциальная окраска основными красителями срезов фиксированной мышцы в зависимости от ее прижизненного состояния. а — 10 мин., б — 30 мин., в — 60 мин., г — 120 мин., д — 180 мин., е — 240 мин., ж — 360 мин.

лориметрировались в пульфриховском ступенчатом фотометре, после чего количество краски в вытяжках из мышц, подвергавшихся до фиксации воздействию высокой температуры, выражалось в процентах по отношению к количеству краски в вытяжках из контрольных мышц (табл. 1). Для проверки методики 10 пар мышц фиксировались без предварительного воздействия одной из них, и у всех этих мышц интенсивность связывания красителя обеими парными мышцами оказалась фактически одинаковой. 5-минутное воздействие дает незначительное (не лежащее вне ошибки в результате неточности методики) уменьшение окрашиваемости. После 10-минутного воздействия этой температурой способность связывать краситель после фиксации возрастает и после 15-минутного воздействия окрашиваемость становится максимальной (табл. 1).

После этого воздействия порог электрической возбудимости уменьшен приблизительно на 50%. Окрашиваемость мышц, зафиксированных после еще более длительного времени действия высокой температуры (25 мин.), падает. Эти мышцы окрашиваются слабее контроля. Как уже указывалось, это обусловлено выходом из отмирающей ткани базофильных веществ. После этого воздействия мышца действительно настолько глубоко повреждена, что отвечает слабым сокращением только при сведенных индукционных катушках. Таким образом, в обеих сериях опытов, проведенных с различной методикой и с воздействиями различной силы, получено очень хорошее совпадение результатов. Так же как в наших предыдущих работах (2-4), окрашиваемость основными красителями ткани, зафиксированной после слабого воздействия, т. е. до начала паранекроза, уменьшается. Уменьшение связывания прижизненного красителя в начале повреждения наблюдал С. Н. Романов (6). Окрашиваемость ткани, зафиксированной после большего воздействия, возрастает; последнее уже соответствует паранекрозу. Фиксированная отмирающая ткань окраши-

Таблица 1

Зависимость окраски фиксированной мышцы от предварительного воздействия температуры (37°)

Фиксация	Краска	Время воздействия в минутах					
		0	5	10	15	20	25
По Кедровскому	Метиленовая зелень	—	— 6	— 3	+11	—	—
		—	—28	+35	+40	—	—
		0	+ 3	+ 7	+ 4	—	—
		0	— 9	+ 5	+ 9	—	— 6
		0	—20	+21	+29	—	—
		0	— 9	0	— 5	—	—
		0	— 5	+ 2	+17	+ 3,5	0
		+3	— 3	+ 3	+ 9	+ 3	—13
		+1	+ 9	+ 8	+ 3	—	—
Формалин	Нейтральный красный	0	— 2	—	—	+ 9	—12
		0	— 4	+ 3	+19	+14	—
		—2	—13	+13	+28	+19	0
		—	— 4,5	+ 8	+13	+ 8	— 6
		—	—11	+ 4	—	+13	—
		—	— 6	+ 9	+11	— 7	—32
		—	—	—	—	—	—
Среднее и ее ошибки		0	—6,5±1,6	+8±2,5	+14±3,2	+8±2,6	—10±3,9

ваются вновь слабо. Таким образом, при паранекрозе не только возрастает способность живой ткани связывать краситель, но эта способность может сохраняться и после ее фиксации.

Наиболее вероятное объяснение этого явления — в накоплении или освобождении при повреждении базофильных веществ или их химически активных групп. Это может осуществляться различными путями. Во-первых, при повреждении в результате денатурации нуклеопротеидов могут освобождаться кислые группы нуклеиновой кислоты, до этого связанные с белком (7, 8). Во-вторых, возможно, что при этом внутри сложной молекулы самой нуклеиновой кислоты происходит разрыв связи между гидроксильными и аминными группами соседних нуклеотидов (9, 10). Наконец, не исключена возможность обменного синтеза новых молекул нуклеиновой кислоты. Согласно А. Н. Белозерскому, в клетке, в зависимости от ее физиологического состояния, легко меняется количество нуклеиновых кислот, не связанных с белком, и именно эти полинуклеотиды и обуславливают базофилию клетки (11, 12). Перевариванием рибонуклеазой для корешков проростков растений и для плавательной перепонки лягушки нами показано, что, действительно, базофилия поврежденной и затем фиксированной ткани обусловлена рибонуклеиновой кислотой (2, 3). Данные о количестве (13, 14) и локализации (15, 16) нуклеиновой кислоты в ткани мышц противоречивы.

В наших экспериментах с мышцей лягушки базофилия фиксированной ткани не исчезает после переваривания рибонуклеазой, а даже несколько возрастает; однако базофилия поперечно-полосатой мышцы крысы исчезает после действия «очень активной рибонуклеазы». Вполне возможно, что в наших экспериментах рибонуклеаза не была достаточно активна, чтобы обусловить полное ее разложение, а начальный этап этого процесса, освобождая ранее связанные кислые группы, обусловил столь необычное возрастание базофилии после действия рибонуклеазы. С другой стороны, конечно, возможно, что в случае лягушки мы имеем дело не с рибонуклеиновой кислотой, а с химически иным соединением.

Как уже указывалось, погибшая в результате экспериментального воздействия, а затем зафиксированная ткань красится всегда основными красками слабо (выход базофильных веществ), но до фиксации такая ткань чрезвычайно интенсивно связывает прижизненные красители. Это может объясняться тем, что при сильных, необратимых воздействиях за усиление окрашиваемости ответственно не накопление нуклеиновой кислоты, а денатурация белков. В связи с этим, если после сильного, обратимого воздействия (100°, 5 мин.) подопытную и контрольную мышцу фиксировать денатурирующими, например сулемовыми, фиксаторами, то после фиксации подопытная ткань не только не красится сильнее контроля (так как последняя теперь также полностью денатурирована), но красится слабее контрольной (в силу выхода из нее базофильных веществ) (см. табл. 2).

Таблица 2

Формалин, %	Целлер-фор-мол, %	Сулема, %
+47	-33	-28
+20	-24	-41
+34	-20	-9
+33	-27	-0
+16	-30	-18
+20	-13	-23
0	-30	-35
+30	-36	
+25±	-27±	-22±

Наоборот, если после такого сильного воздействия опытная и контрольная мышца фиксированы неденатурирующим фиксатором например формалином, то и после фиксации подопытная мышца красится сильнее контрольной (табл. 2). Таким образом, при обратимых повреждениях усиление окрашиваемости обусловлено накапливающимися нуклеиновыми кислотами (или другими базофильными соединениями). Возможные пути их накопления обсуждались выше. При более глубоких повреждениях это обусловлено другим механизмом — денатурацией всех белков. При витальном окрашивании ткани оба механизма

одинаково обуславливают усиление связывания красителя.

В нашем представлении накопление нуклеиновых кислот при репарируемом повреждении обуславливает усиление белкового синтеза, необходимого при репарации повреждения.

Чем же может быть вызвано уменьшение окрашиваемости при начальных этапах повреждения? Быть может, тем, что трата нуклеиновой кислоты уже наступила, но еще не наступил регуляторный процесс (накопление нуклеиновой кислоты), начинающийся в начале паранекроза и обусловленный им.

Институт экспериментальной медицины
Академии медицинских наук СССР

Поступило
17 XI 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Д. Н. Насонов и В. Я. Александров, Реакция живого вещества на внешние воздействия, изд. АН СССР, 1941. ² А. Н. Трифонова, ДАН, 59, № 6 (1948). ³ А. Н. Трифонова, ДАН, 61, № 5 (1948). ⁴ А. Н. Трифонова, Тр. АМН СССР, 3 (1949); Тр. гистол. конференции, 1947, стр. 33. ⁵ Л. Ф. Ларионов, Тр. I сессии АМН СССР, 1947. ⁶ С. Н. Романов, ДАН, 66, № 2 (1949). ⁷ А. Р. Кизель, Химия протоплазмы, изд. АН СССР, 1949. ⁸ A. Boivin, C. R. Soc. Biol., 149, No. 19—20 (1948). ⁹ L. Michaelis, Cold Spr. Harbor Symposia, Quant. Biology, 12, 131 (1947). ¹⁰ M. Gouland and D. O. Jordan, Sympos. Soc. Exp. Biol., No. 1, 5 (1947). ¹¹ А. Н. Белозерский, Микробиология, 10, 185 (1940). ¹² А. Н. Белозерский, Cold Spr. Harbor Symposia, 12, 1 (1947). ¹³ J. N. Davidson, Symposia Soc. Exp. Biol., No. 1, 77 (1947). ¹⁴ J. Clavert, L. Mandel et M. Jacob, C. R. Soc. Biol., 143, No. 7—8, 539 (1949). ¹⁵ T. Caspersen, Naturwissenschaft, 29, 363 (1941). ¹⁶ T. Caspersen u. B. Theorell, Acta Physiol. Scand., 4, 2 (1942).