

Т. М. ЯКОВЛЕВА

ГЛИКОГЕН И ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА КАК ХАРАКТЕРНЫЕ ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РЕГЕНЕРАЦИОННОЙ КЛЕТКИ

(Представлено академиком А. И. Абрикосовым 10 I 1953)

Настоящая работа является продолжением исследования о цитохимических показателях превращения клеток дифференцированной соединительной ткани плавниковой части хвоста аксолотля в клетки регенерационной бласты (регенерационные клетки). В качестве таких показателей здесь рассматриваются гликоген и щелочная фосфатаза. Реакция на обнаружение щелочной фосфатазы была произведена двумя способами: по методу Гомори (1) на срезах и способом тотальной обработки регенератов (модификация Кедровского). При этих методах места активности фосфатазы приобретают коричневую окраску.

Регенераты хвоста половозрелого белого аксолотля были зафиксированы охлажденным ацетоном через 7, 9, 12, 13, 16 и 26 суток, и часть из них была использована для выявления фосфатазы на срезах. Другая часть регенератов после фиксации ацетоном была обработана на выявление щелочной фосфатазы тотально и только после этого подверглась обычной гистологической обработке. Субстратом для выявления мест активности щелочной фосфатазы служил натрий-глицерофосфат. В том и другом случае срезы были докрашены эозином или, в некоторых случаях, по Маллори. Хорошие и отчетливые картины выявления мест активности щелочной фосфатазы были получены при применении тотального метода обработки. В тех же случаях, когда реакция была произведена на срезах, наблюдалась совершенно тождественная картина распределения мест активности щелочной фосфатазы, но интенсивность окраски была вообще значительно слабее.

Фибробласты плавниковой соединительной ткани хвоста аксолотля, после применения реакции на выявление мест активности щелочной фосфатазы, отличаются вполне характерными признаками. Ядерная оболочка темнокоричневая, хроматин (мелко распыленный или собранный в более или менее крупные глыбки) темнокоричневый на светлокорицневом фоне. Ядрышко при докраске эозином розовое. Плазма светлокорицневая, в некоторых случаях плазма несколько темнее, но всегда светлее ядра. Межклеточное промежуточное вещество светлокорицневое, пучки коллагеновых волокон слабо выявлены. На срезах регенератов, зафиксированных через 7, 9 и 12 суток после ампутации, когда уже имеется бластема с типичными регенерационными клетками, в удаленной от раневой поверхности ткани фибробласты и межклеточная среда характеризуются указанными выше признаками. Однако чем ближе к раневой поверхности, тем более темными и грубыми становятся структуры межклеточного вещества, и у самой плоскости ампутации можно видеть толстые пучки коллагеновых волокон, проходящие от одной стороны плавника к другой и окрашенные очень интенсивно в темнокоричневый, почти черный цвет.

Фибробласты, лежащие среди этих пучков волокон, имеют крупные, почти черные ядра. Ядра эти кажутся еще темнее, потому что они довольно густо заполнены темнокоричневыми глыбками хроматина на светлокоричневом фоне. Ядрышко, повидимому, маскировано хроматином и с первого взгляда кажется темнокоричневым, однако, при внимательном рассмотрении можно видеть, что оно все-таки розовое. Плазма этих клеток темнокоричневая, почти такого же оттенка, как и ядро. Так как фибробласты соединительной ткани обычно находятся на различных ступенях дифференцировки, то среди клеток, подобных описанным, естественно, встречаются клетки с менее крупными ядрами и более светлой плазмой. Благодаря толстым пучкам коллагеновых волокон и характерному строению описанных клеток, граница между старой тканью и образовавшимся над ней участком регенерационной бластемы в большинстве случаев легко отличима. Далее следуют клетки регенерационной бластемы. В этих клетках, имеющих типичную для регенерационной клетки форму, плазма и ядро окрашены даже в несколько более светлый оттенок, но также достаточно интенсивно. Несмотря на то, что ядра регенерационных клеток значительно больше ядер фибробластов, удаленных от раны участков, они не кажутся светлее благодаря интенсивно выявленному темнокоричневому хроматину на светлокоричневом фоне. Ядрышко розовое. Интенсивность коричневой окраски плазмы такая же, как и ядра. По мере дальнейшего течения процесса регенерации и дифференциации клеток бластемы в клетки плавниковой соединительной ткани интенсивность окраски цитоплазмы уменьшается и клетки постепенно становятся такими, какими мы их находим в нормальной плавниковой соединительной ткани.

При окраске по Маллори никакой разницы в толщине между пучками коллагеновых волокон участка ткани, прилегающего к раневой поверхности, и участков, удаленных от раны, не наблюдается.

Кроме регенератов хвоста, были зафиксированы и тотально обработаны сформированные личинки аксолотля, зафиксированные накануне их вылупления. Клетка мезенхимного синцития сформированной личинки имеет коричневое ядро приблизительно такого же оттенка, как ядро регенерационной клетки, но более слабо структурированное, розовое ядрышко, коричневую цитоплазму, еще содержащую желток.

Контролем служили регенераты (или срезы), не помещавшиеся в среду, содержащую натрий-глицерофосфат. В этих случаях препараты оказались окрашенными лишь одним эозином.

В последнее время появились указания на возможность артефактов при применении метода Гомори. Однако резкое различие между пучками коллагеновых волокон нормальной и регенерирующей ткани, не наблюдающееся при окраске по Маллори, неокрашиваемость ядрышка и некоторые другие факты заставляют признать, что если и имеет место артефакт, то одновременно с ним и в большей степени имеет место и активность фосфатазы, вызывающая резкие контрасты в окраске указанных тканей. В эпителии реакция на обнаружение мест активности щелочной фосфатазы была или отрицательна или давала слабое окрашивание без какого-либо усиления регенерата.

Для установления содержания гликогена регенераты хвоста аксолотля были зафиксированы нейтральным фиксатором А. Л. Шабадаша (2) последовательно от 1 до 5 суток и, кроме этого, через 7 и 10 суток после ампутации хвоста. Реакция на обнаружение гликогена была произведена как по методу А. Л. Шабадаша, так и по методу Бауэра (3). Гликоген, согласно этим методам, характеризуется ярким красно-фиолетовым окрашиванием. Необходимо отметить значительно более яркий тон краски при реакции по методу А. Л. Шабадаша. Однако выявление гликогена тем и другим методом совпадало. Там, где гликоген не был обнаружен методом Бауэра, он не был обнаружен и методом А. Л. Шабадаша. Контролем

служили срезы, предварительно обработанные птпиалином слюны либо не подвергавшиеся действию периодата калия или хромовой кислоты.

Клетки нормальной соединительной ткани плавниковой части хвоста аксолотля, как правило, совершенно не дают положительной реакции на гликоген. Только изредка можно встретить мельчайшие едва заметные пылевидные гранулы (1—4 на клетку). В эпителии красно-фиолетовое окрашивание можно наблюдать лишь в наружном роговом слое, но в этом случае мы, повидимому, имеем дело не с гликогеном, так как это окрашивание сохраняется и в контроле. Гликоген в раневом эпителии хорошо заметен уже через сутки после ампутации хвоста. Он появляется в виде ярко окрашивающихся гранул, расположенных всегда полярно по отношению к основанию эпителиальной клетки на более светлом краснофиолетовом фоне. Остальная часть клетки обычно не имеет фиолетового окрашивания. В это же время гликоген можно наблюдать также и в макрофагах. На этой стадии регенерации бластема еще не образовалась, хотя под регенерационным эпителием уже можно наблюдать в небольшом количестве клетки с крупными светлыми ядрами. В этих клетках иногда в единичных случаях в небольшом количестве можно наблюдать гликоген. Гликоген в эпителии сохраняется легко и его можно видеть на 10 сутки после ампутации. Только на 4 сутки можно наблюдать скопление под раневым эпителием регенерационных клеток с крупным ядром, отчетливо выделяющимся ядрышком, короткоотростчатой плазмой и появление в них гликогена. В плазме этих клеток отчетливо выделяются участки, заполненные яркими красно-фиолетовыми гранулами гликогена, и участки, дающие диффузное красно-фиолетовое окрашивание. Просматривая каждый срез в направлении от удаленных участков ткани к регенерационной бластеме, можно наблюдать, как с приближением к бластеме гранулы гликогена начинают появляться в клетках все в большем количестве. Не все клетки регенерационной бластемы дают одинаково яркую реакцию на гликоген. Реакция на гликоген наблюдается только в цитоплазме регенерационных клеток, ядро и ядрышко ее никогда не дают. У аксолотлей, зафиксированных через 10 суток после ампутации, т. е., когда в центральной части плавника уже началось новообразование мышц, а в плавниковой части началось уже превращение регенерационных клеток в клетки соединительной ткани, лишь кое-где очень редко встречаются клетки, содержащие гликоген. Эпителий, однако, еще им очень богат.

Реакция на обнаружение гликогена была также произведена на поперечных срезах через личинки аксолотля, зафиксированные незадолго до вылупления и в момент вылупления. Плазма эпителиальных клеток мезенхимного синцития личинок показывает очень хорошую реакцию на обнаружение гликогена. Можно наблюдать яркое красно-фиолетовое окрашивание в отдельных участках плазмы. Контрольные препараты показали отсутствие красно-фиолетового окрашивания как в плазме клеток регенерационного эпителия, так и в плазме регенерационных клеток и в плазме эпителиальных и мезенхимных клеток личинок.

Таким образом, при преобразовании фибробластов плавниковой соединительной ткани аксолотля в клетки регенерационной бластемы происходит очень резкое повышение активности щелочной фосфатазы в плазме и хроматиновых структурах ядра преобразующихся клеток, а также в промежуточном неклеточном веществе, в находящихся вблизи раневой поверхности пучках коллагеновых волокон. Одновременно с увеличением активности фосфатазы в преобразующихся клетках начинает синтезироваться гликоген, и в клетках регенерационной бластемы количество его становится значительным. Ядро регенерационной клетки не содержит гликогена. Ядрышко не показывает активности щелочной фосфатазы и не содержит гликогена. Клетка мезенхимного синцития личинки аксолотля, зафиксированная накануне вылупления, по содержа-

нию в плазме гликогена и активности щелочной фосфатазы дает показатели, совпадающие с таковыми регенерационной клетки. Регенерационный эпителий характеризуется обилием гликогена, но слабой активностью фосфатазы. Однако Карцмару (4) на определенной стадии регенерации удалось наблюдать активность щелочной фосфатазы в раневом эпителии. С последующей дифференциацией регенерационных клеток в клетки плавниковой соединительной ткани активность щелочной фосфатазы постепенно ослабевает и гликоген исчезает.

Итак, при преобразовании клеток плавниковой соединительной ткани в регенерационные происходит возрастание относительного количества рибозонуклеиновой кислоты (5), гликогена и исключительное повышение активности щелочной фосфатазы. По общепринятому мнению, щелочная фосфатаза, открываемая методом Гомори, является нуклеотидазой и наличие ее может говорить о глубоком распаде нуклеиновых кислот. Однако, по данным Либкнехта (6) и Муг (7), возможно расщепление щелочной фосфатазой аденозинтрифосфорной (аденилпирофосфорной) кислоты. Как известно, молекула последней содержит две богатых энергией (макроэргических) связи, при участии которых повидимому, только и возможен синтез сложных биологических соединений (8).

Таким образом преобразование клеток дифференцированной соединительной ткани в регенерационные, повидимому, характеризуется тем, что в результате действия ферментов, связанных с системой аденозиндифосфорной — аденозинтрифосфорной кислот, в плазме клеток происходит усиленное накопление рибозонуклеиновой кислоты и гликогена (последнего — за счет циркулирующей в крови глюкозы). Для осуществления регенерации органа необходимо, как показал Д. П. Филатов (9), достижение blastemой определенного объема. Последний достигается усиленным размножением клеток регенерационной blastемы. Энергию для синтеза сложных биологических соединений дает гликолитический распад гликогена, осуществляющий ресинтез аденозинтрифосфорной кислоты с ее макроэргическими связями. Наличие гликогена при регенерации установила Е. А. Владимирова (10), изучавшая содержание молочной кислоты в регенерирующей конечности аксолотля и находившая максимальное количество последней на стадии конуса, характеризующейся наибольшим количеством митозов. На роль нуклеиновых кислот как веществ роста и развития указывал Б. В. Кедровский (11).

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

Поступило
8 IX 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Д. Глик, Методика гисто- и цитохимии, 1950. ² А. Л. Шабаташ, Проблема гистохимического исследования гликогена нормальной нервной системы, 1949. ³ Г. И. Роскин, Микроскопическая техника, 1946. ⁴ А. G. Karczmar, G. G. Berg, J. Exper. Zool., 117, No. 1 (1951). ⁵ Т. М. Яковлева, ДАН, 41, № 6 (1943). ⁶ W. L. Liebkecht, Biochem. Z., 503, H. 1—2 (1939). ⁷ F. Moog, H. Steibach, Science, 103, No. 2666 (1946). ⁸ Э. Болдуин, Основы динамической биохимии, 1949. ⁹ Д. П. Филатов, Журн. эксп. биол., № 7 (1931). ¹⁰ Е. А. Владимирова, Тр. лабор. эксп. зоол. и морфол. животных АН СССР, 4 (1935). ¹¹ Б. В. Кедровский, Биол. журн., 6, 5—6 (1937).