

А. Л. ШАБАДАШ

ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ ТИГРОИДА НЕРВНЫХ КЛЕТОК

(Представлено академиком Н. Н. Анчиковым 8 V 1953)

Глыбки тигроидного вещества являются характерным органоидом нервных клеток, их наличие типично для абсолютного большинства клеток нервной системы. Лишь у немногих мелких нейронов мозга этот диагностический признак выражен нечетко. Тигроид — лабильное образование; изменения физиологических условий деятельности организма, а тем более патобиоз, вызывают разнообразное превращение тигроидных зерен. В одних случаях они приводят к их полному исчезновению, в других — после различных дегенеративных состояний — наблюдается восстановление органоида.

Состав тигроидных глыбок за последнее время в достаточной степени выяснен: обязательным компонентом является рибонуклеиновая кислота (^{1, 2}), оксифильные белки основы (с увеличенным содержанием диаминокислот — аргинина и лизина), а в ряде клеток (корешковые клетки спинного и головного мозга, ганглиозные клетки спинальных и черепно-мозговых узлов, клетки вегетативной нервной системы и др. (^{5, 6})) — гликоген.

Необходимость избирательного и теоретически обоснованного метода микроскопического выявления рибонуклеопротеидов (РНП) тигроида, как его универсальной и необходимой составной части, особенно очевидна в свете Павловской физиологии.

Несмотря на известный успех выяснения составных частей тигроидного вещества, его микроскопическое обнаружение до сих пор осуществляется по устаревшим эмпирическим прописям Ниссля (³), далеким от требований точности научного метода. Во-первых, окраска по Нисслию не серийна и не дает стандартно-сравнимых результатов: каждый срез необходимо подогревать в растворе краски до ее закипания (в ряде случаев дважды), т. е., другими словами, отдельные срезы серии обрабатываются неодинаковым временем цветным реактивом. Во-вторых, перекрашенный таким способом срез необходимо дифференцировать (в анилиново-спиртовой смеси) до обесцвечивания различных структур и ясного выявления тигроида. Очевидно, что выполнение этих приемов неизбежно вносит значительную долю субъективизма в конечные результаты, так как искомое (именно, степень концентрации или распыленности тигроидного вещества) является в то же время определяющим признаком окончания реакции обнаружения. В-третьих, способ Ниссля, как это теперь ясно, реализуется при наличии в клетке РНП; однако классическая техника Ниссля не создает условий для избирательного выявления РНП, так как процесс осуществляет в щелочной среде*, которая, в силу солеобразова-

* Пропись Ниссля содержит щелочное мыло в составе красящей смеси.

ния с нуклеопротеидами, а отчасти их растворения, создает помехи для установления истинного уровня содержания РНП. Совокупность перечисленных недостатков вынуждает отказаться от техники Ниссля во всех тех случаях, где речь идет о серийном, точном, допускающем количественный учет результатов обнаружения тигроида в физиологических и патологических условиях.

Реактивность нервных клеток, одним из показателей которой являются изменения дисперсности тигроида, может быть объективно учтена в микропрепаратах лишь на основе химически обоснованной, стандартной по условиям осуществления цветной реакции, исключаящей какие бы то ни было элементы субъективности.

Возможность избирательной гистохимической реакции на РНП нервных (и других) клеток вполне реальна. Мы использовали известный факт, что нуклеопротеиды являются белками с резко выраженными кислотными валентностями. Их изоэлектрическая зона (ИЭЗ) соответствует примерно рН 3,5—3,8 (с небольшими вариациями). Другие белки характеризуются иной ИЭЗ (например, цитоплазма многих эпителиальных клеток рН 4,5—4,8; альбумин сыровотки рН 4,9—5,3; глобулины рН 5,0—6,0 и т. п.). Таким образом, различия ИЭЗ нуклеопротеидов и других белков создают предпосылки для избирательного обнаружения РНП; в условиях стабилизированного кислого рН (от 4 до 4,5) основные красители будут реагировать только с нуклеопротеидами (или другими кислыми белками), остальные белковые компоненты нервной или глиальной ткани не могут участвовать в реакции, так как при данном рН среды им свойственно связывать лишь кислотные красители.

Таким образом, принцип метода гистохимического обнаружения тигроида ясен: рибонуклеопротеиды нервных клеток будут избирательно связывать основной краситель (метиленовую синь, химически чистую) в растворе буфера с кислым рН (от 4,2 до 4,5).

Опытная обработка серии срезов спинного мозга и спинальных ганглиев в растворе метиленовой сини с варьируемым рН показала, что связывание красителя имеет место уже при рН 4,0—4,1. Однако четкие морфологические результаты достигаются концентрацией водородных ионов рН 4,3—4,5. При этом РНП тигроида ганглиозных клеток при прочих равных условиях связывает краситель интенсивнее, чем аналогичные структуры нейронов спинного и головного мозга. Поэтому для первых оптимальное для окраски рН равно 4,3, а для вторых — рН 4,5. Следует также отметить, что хотя определяющим условием реакции является рН раствора, однако и качественный состав буферной смеси влияет на конечный результат: ацетатные, цитратные и фосфатные смеси при одном и том же рН отличаются нюансировкой деталей.

Для практических целей и в целях технического упрощения реакции без снижения ее достоверности мною применены кислые соли фосфорной кислоты, раствор которых (в силу гидролиза) создает нужную концентрацию водородных ионов. Солевой раствор с рН 4,3 получают растворением 1,15 г однозамещенного фосфорнокислого аммония в 100 мл воды; для рН 4,5 растворяют 1,38 г NaH_2PO_4 в 100 мл воды.

Условия применения реакции: 1) фиксация: спирт — формалин (9 : 1) или АСuF (Шабадаш); 2) заливка: парафин или целлоидин; 3) цветная реакция на РНП: срез погружают на 5 мин. в смесь 0,25% метиленовой сини хим. чистой * 20 мл, солевого раствора (рН 4,3 или 4,5) 10 мл, дистиллированной воды (лучше дважды дистиллированной) 170 мл; 4) отмывка излишка краски: 5 мин. в двух сменах смеси солевого раствора (с тем же рН, что в п. 3) 10 мл, дистиллированной воды 60 мл; 5) закрепление результатов в водном 6% растворе молибденовокислого аммония 15—20 мин.; 6) ополоснуть дистиллированной водой, 70, 96 и 100° спирт (быстро!); 7) ксилол; нейтральный канадский бальзам.

* Продажные препараты красителя требуют очистки двукратной кристаллизацией.

Результаты.

Основные преимущества гистохимического обнаружения тигроида нервных клеток по РНП состоят в том, что: 1) цветная реакция осуществляется при комнатной температуре в течение короткого срока; 2) исключается какая бы то ни было дифференцировка, что позволяет обрабатывать серии срезов в одинаковых условиях при стандартно-сравнимых результатах; 3) наряду с крупными глыбками выявляются мельчайшие зернышки нуклеопротеидного характера, что позволяет с большей точностью судить о процессах распада или ресинтеза.

Кроме РНП в цитоплазме, выявляются РНП ядрышка; ядерные нуклеопротеиды, в состав которых входит тимонуклеиновая кислота, отчетливо связывают краситель при данном рН. Однако, как известно, существуют специальные методы, позволяющие в микропрепаратах отличать тимо- и рибонуклеинаты (например, реакция Фельгена).

Но особенно важно то, что наш метод, помимо его простоты и надежности, выявляет, по сравнению с эмпирической окраской по Нисслию, ряд новых фактов, существенных для изучения гистофизиологии нервной ткани; он вскрывает разнообразные стороны белкового обмена в их конкретном выражении. Так например, отчетливо демонстрируются качественные различия тигролиза в физиологических и патологических условиях. При экспериментальном повреждении периферических отростков ганглиозных спинальных клеток и клеток гассерова узла количественная убыль РНП в первые дни реактивных изменений выражается лишь в уменьшении числа и размеров глыбок, при сохранении ими синего цвета окраски; однако на 5—7 дни травматического тигролиза распад нуклеопротеидов вызывает качественные изменения белков цитоплазмы, что обуславливает зеленую закраску тела клетки. На этом фоне различимы темносиние точечные гранулы, которые мельче и компактнее тигроидных зерен и темнее их окрашиваются; количество их невелико, в некоторых клетках они сосредоточны вблизи поверхности, а в период восстановления увеличение их числа в околядерной зоне является одним из первых признаков регенеративных усилий нейрона.

Физиологическое самообновление тигроида происходит в нервных клетках ежеминутно, восполняя трату веществ во время деятельности. Повреждение отростков (в том числе при заболеваниях у человека) вызывает усиление регенеративных процессов и в то же время их качественные изменения.

Травма должна расцениваться как «чрезвычайный» (по И. П. Павлову ⁽⁴⁾) раздражитель. Гистохимическим показателем своеобразной реакции белков нейрона является их зеленая окраска при взаимодействии с синим красителем и появление зерен нуклеиновых кислот.

Другим примером продуктивности нашего метода является обнаружение особого реактивного состояния спинальных нейронов при различных воздействиях на их рецепторные отростки и окончания. Наблюдается обводнение клетки и специальная форма тигроида в виде мелкозернистых глыбок, густо заполняющих ее тело. Раздробленность тигроида не сопровождается деградацией РНП. Оценка обнаруженных картин сложна. Сходные, но не совпадающие в деталях образования описывались различными авторами как «гиперхромные», «пикноморфные», «темные» клетки. Несомненно, что такие клетки отличны от «оптимальной» нормы, но не могут быть отнесены к патологически измененным формам. Обнаруженная нами интенсификация белкового обмена в ядре, ядрышке и тигроиде позволяет считать данную категорию нейронов физиологическими, но находящимися в состоянии значительного реактивного напряжения образованиями. Следуя мыслям И. П. Павлова о «физиологической мере защиты», следует расценивать такие клетки как «фазу сопротивления», с особым постоянством возникающую в средних и малых ганглиозных клетках.

Наконец, для суждения о физиологических и патологических процессах в нервной системе существенно четкое обнаружение нашим методом белкового компонента липофусцина. Как известно, липофусцин называют «пигментом изнашивания», хотя условия его появления в клетке не изучены. Предполагают, что он является продуктом внутриклеточного обмена, повидимому, отбросом, накапливающимся при ослаблении жизнедеятельности тканей. В симпатических ганглиозных клетках липофусцин встречается у «нормальных» субъектов. Белковая основа этого пигмента не изучена. При окраске по Ниссли в некоторых случаях удавалось обнаруживать патологические скопления липофусцина в виде объемистых зернистых включений. Наш метод отчетливо выявляет белковый компонент (возможно, предшественника полного комплекса липофусцина) пигмента в виде черно-синих зерен разнообразной величины, начиная от мельчайших точечных образований, располагающихся между неизменными глыбками тигроида, и до крупных зернистых скоплений в тигролизированных (частично или полностью) нейронах. В опытах с ретроградной дегенерацией удалось уловить начальные стадии оформления белкового «носителя» липофусцина. При повреждении ветвей тройничного нерва установлено, что он возникает на 15—20 день и прогрессивно увеличивается к 60—100 дням. Накопление его происходит, главным образом, в клетках среднего диаметра (В-тип); крупные нейроны (А-тип) редко поражаются этим процессом. Наши препараты, наряду с другими подробностями, демонстрируют транспорт белкового «носителя» из нейрона в клетки-сателлиты, где он (у человека — часто) принимает кристаллическую форму, а также картины задержки эвакуации измененного белка и накопление «шлаков» в нейроглии.

Важно подчеркнуть, что травма (или грубо раздражение) чувствительных ветвей гассерова узла вызывает в последующем поражение «пигментом изнашивания» не всех, а лишь определенной категории нейронов, тогда как абсолютное большинство глиальных сателлитов, независимо от типа окружающей ими нервной клетки, заполнено черно-коричневыми зернами липофусцина. Физиологический смысл этого явления и пути управления им, очевидно, заслуживают внимания экспериментаторов.

Таким образом, разработанная нами методика обнаружения типичного органоида нервной клетки вскрывает разнообразные стороны ее нормального и патологического белкового обмена.

Московский медицинский стоматологический институт
Министерства здравоохранения РСФСР

Поступило
8 V 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ T. Caspersson, Cell Growth and Cell Function, 1950. ² Б. В. Келровский, Усп. совр. биол., 31 (1951); 32 (1951). ³ Fr. Nissl, Arch. f. Psychiatrie, 1894. ⁴ И. П. Павлов, XX-летний опыт объективного изучения высшей нервной деятельности животных, изд. 6, 1938. ⁵ А. Л. Шабадаш, Бюлл. эксп. биол. и мед., 10 (1940). ⁶ А. Л. Шабадаш, Проблемы гистохимического исследования гликогена нормальной нервной системы, 1949.