

Т. М. ЯКОВЛЕВА

ЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ЗАЖИВЛЕНИЯ РАНЫ У БЕЛОЙ МЫШИ

(Представлено академиком А. И. Абрикосовым 6 VIII 1953)

В данной работе было произведено исследование изменения некоторых цитохимических свойств эпителия и подкожной соединительной ткани при заживлении кожной раны у белой мыши. Были использованы: реакция Фельгена на выявление тимонуклеиновой кислоты ядра; окраска азур II-эозином на выявление рибозонуклеиновой кислоты протоплазмы; реакция на выявление мест активности щелочной фосфатазы и реакция на обнаружение гликогена.

Каждой мыши была нанесена остро отточенной бритвой рана длиной около 0,5 см, в задней части спины с левой стороны. Затем через сроки от 1 до 7 суток под обычным эфирным наркозом кусочки кожи, с нанесенной раной удалялись одновременно у четырех животных и фиксировались каждый одним из следующих фиксаторов: а) фиксатором Сан-Феличе, в модификации С. Л. Фроловой; б) фиксатором Бирх-Гиршфельда; в) фиксатором Шабаша; г) охлажденным ацетоном.

В соответствии с примененным фиксатором срезы толщиной в 8 μ были обработаны на: а) реакцию Фельгена; б) окраску азур II-эозином; в) реакцию на выявление гликогена; г) реакцию на выявление мест активности щелочной фосфатазы.

Применение реакции Фельгена не дало возможности установить ясного и не вызывающего сомнения увеличения или уменьшения интенсивности фиолетового окрашивания или количества окрашенных хроматиновых частиц как в наползающем под кровяным сгустком эпителии, так и в фибробластах соединительной ткани, что противоречит наблюдениям Р. Цанева (1).

Зарисовки при помощи рисовального аппарата дают возможность установить, что ядра наползающего эпителия по своим размерам больше, чем ядра нормального эпителия и что фиолетовые хроматиновые структуры расположены в них на большем расстоянии, чем в ядрах нормального эпителия. Это создает картину более светлого ядра. Если в ядрах нормального эпителия чаще можно встретить большое количество глыбок хроматина, то в ядрах регенерационного эпителия чаще можно встретить более крупные глыбки. Такую же картину можно наблюдать и в отношении ядер фибробластов соединительной ткани. Все это заставляет придти к заключению, что если ограничивать изучение тимонуклеиновой кислоты в регенерирующих тканях только применением реакции Фельгена, то никаких обоснованных выводов относительно ее увеличения или уменьшения при регенерации сделать нельзя.

Работами (1-5) можно считать твердо установленным, что базофилия протоплазмы эпителиальной и соединительнотканной клетки обусловлена присутствием в клетке рибозонуклеиновой кислоты (6, 7). На основании этого окраска азур II-эозином, выявляющая базофилию протоплазмы,

является методом обнаружения в протоплазме клетки рибозонуклеиновой кислоты.

Реакция на выявление гликогена производилась как по методу А. Л. Шабаша (8), так и по методу Бауэра (9). Места обнаружения гликогена тем или иным способом полностью совпадали, однако интенсивность красно-фиолетового окрашивания при реакции по методу Шабаша значительно больше, чем при реакции по методу Бауэра. Контролем служили срезы: а) не обработанные периодатом калия или хромовой кислотой и б) обработанные предварительно птиалином слюны.

Для выявления мест активности щелочной фосфатазы была применена реакция по методу Гомори, в модификации Кедровского (тотальный метод обработки). Субстратом для выявления активности фосфатазы служил натрий глицерофосфат.

Эпителий мышцы является в среднем 4—6-слойным. После окраски азур II-эозином протоплазма эпителиальных клеток, особенно нижних слоев, интенсивно базофильна, т. е. богата рибозонуклеиновой кислотой. Реакция на обнаружение гликогена в эпителии дает отрицательный результат. Реакция на обнаружение мест активности щелочной фосфатазы дает также отрицательный результат, или ограничена одними ядрами. Фибробласты подкожной соединительной ткани имеют слабо базофильную плазму. Реакцию на выявление гликогена они не показывают. После применения реакции на выявление мест активности фосфатазы коричневую окраску приобретают лишь ядра фибробластов волокнистой соединительной ткани. Пучки коллагеновых волокон остаются совершенно неокрашенными или окрашенными очень слабо. Коричневую окраску плазмы приобретают лишь фибробласты, расположенные вблизи капилляров.

Заживление раны начинается с напозания эпителия под кровяной сгусток в виде двуслойного выступа. Через сутки после нанесения раны окраска азур II-эозином никакого увеличения базофилии в напозающем эпителии не показывает. В отдельных клетках напозающего эпителия в небольшом количестве можно наблюдать гликоген в виде красно-фиолетовых гранул, расположенных небольшими группами, главным образом вблизи ядра. Уже на этой стадии в напозающем эпителии обнаруживается очень сильная активность щелочной фосфатазы. Особенно интенсивно реагирует ядро. В соединительной ткани вблизи капилляров можно наблюдать, как и указывают авторы (5, 10), фибробласты с базофильной плазмой, светлым ядром и отчетливо выделяющимся ядрышком. Скопления таких клеток вблизи раны еще нет.

Фибробласты соединительной ткани, где бы они ни были расположены, реакции на обнаружение гликогена не показывают. В большом количестве гликоген можно наблюдать в скопляющихся вблизи кровяного сгустка макрофагах. Все клетки и не клеточные структуры соединительной ткани, находящиеся вблизи раны, дают усиление реакции на обнаружение мест активности щелочной фосфатазы. Интенсивно реагируют ядра фибробластов; в некоторых случаях можно заметить отчетливо выделяющуюся окрашенную в серо-коричневый цвет плазму. Хорошо выделяются ядрышки своей отчетливо реагирующей оболочкой. Фибробласты, находящиеся вблизи капилляров, показывают отчетливую реакцию ядра, плазмы и ядрышка.

Через 2 суток эпителий напозает под кровяной сгусток уже в виде большей частью четырехслойного клина (языка) (11). После окраски азур II-эозином можно заметить, что выступ напозающего эпителия несколько более базофилен, чем остальной эпителий, хотя резкого увеличения базофилии не происходит. Гликоген содержится во всех слоях напозающего эпителия в очень большом количестве. На этой стадии раздражение, вызванное ранением, вызывало усиление активности щелочной фосфатазы в эпителиальных клетках на протяжении всего среза и в эпителиальных клетках участков кожи, находящихся довольно далеко от раны, видны

хорошо окрашенное в коричневый цвет ядрышко, несколько более слабо окрашенное ядро и светло-коричневая плазма. В наползающем эпителии (языке) интенсивность коричневой окраски всех этих трех элементов клетки резко усиливается. В соединительной ткани на этой стадии можно проследить постепенный переход от фибробластов, расположенных вблизи сосудов, до молодых фибробластов, скопляющихся вблизи раны. Эти клетки обладают всеми признаками клетки «эмбрионального типа» (12), короткоотростчатой плазмой, большим ядром, светлым при окраске азури II-эозином, и отчетливо выделяющимся ядрышком. Реакции на обнаружение гликогена эти клетки не показывают. Макрофаги, обильно содержащие гликоген, можно наблюдать в еще большем числе, чем это было описано для предыдущей стадии. После реакции на обнаружение мест активности фосфатазы в соединительной ткани все клетки, прилегающие к ране, дают усиление коричневого окрашивания в ядре с более четким выявлением хроматиновых структур. В некоторых случаях хорошо выделяется окрашенная в коричневый цвет плазма. Хорошо выделяется ядрышко своей отчетливо выявленной оболочкой. Вблизи капилляров можно наблюдать описанные выше клетки, обнаруживающие резкое повышение активности фосфатазы в ядрышке, ядре и плазме.

Через 3 суток рана уже почти затянута эпителием. В отношении выявления мест активности щелочной фосфатазы и рибозонуклеиновой кислоты как в эпителии, так и в соединительной ткани картина, примерно, аналогична предыдущей стадии. Попрежнему наблюдается обилие гликогена в клетках регенерационного эпителия и макрофагах. Докраска гематоксилином дает возможность выявить скопление под эпителием молодых фибробластов, но самый тщательный просмотр не дал возможности обнаружить в их плазме гликоген.

Через 4 суток рана уже затянута многослойным эпителием. После окраски азури II-эозином по своей базофилии этот эпителий ничем не отличается от нормального, гликоген содержится в нем все так же в очень значительном количестве. После реакции на обнаружение мест активности щелочной фосфатазы плазма клеток молодого эпителия имеет уже значительно более светлый (слабо коричневый) оттенок, чем ядро, ядрышко попрежнему окрашено наиболее темно. Молодая соединительная ткань содержит еще много молодых фибробластов, протоплазма их базофильна с различной интенсивностью окраски азуром. Гликогена они не содержат. После реакции на обнаружение мест активности щелочной фосфатазы среди клеток молодой соединительной ткани еще можно встретить много клеток с интенсивно окрашенной в коричневый цвет протоплазмой.

Через 6 суток в раневом эпителии можно наблюдать дальнейшее ослабление реакции на обнаружение мест активности щелочной фосфатазы. Однако содержание гликогена в нем все также велико. В молодой соединительной ткани идет процесс образования преколлагеновых волокон, большинство фибробластов все еще сохраняет базофилию плазмы.

Через 7 суток базофильный многослойный эпителий полностью покрывает рану. Однако базофилия его не больше, чем базофилия нормального эпителия. Гликоген в молодом эпителии уже почти совершенно отсутствует. Фибробласты молодой соединительной ткани еще сохраняют базофилию плазмы.

Таким образом, из работы видно, что с первых же суток наползания на рану эпителиальных клеток в протоплазме этих клеток начинает появляться гликоген и значительно повышается активность щелочной фосфатазы во всех элементах клетки. Протоплазма этих клеток начинает так же интенсивно окрашиваться в коричневый цвет, как и ядро. Резко выделяется ядрышко. Значительное количество гликогена и высокая активность фосфатазы наблюдаются вплоть до закрытия раны многослойным эпителием, после этого восстанавливаются отношения, свойственные нормальному эпителию. Так как в нормальном эпителии мыши клетки

обладают исключительно базофильной протоплазмой, синей после окраски азур II-эозином, то, применяя на выявление рибозонуклеиновой кислоты только этот метод окраски, трудно уловить какое-либо изменение базофилии. Возможно, что поэтому мне удалось наблюдать лишь незначительное возрастание базофилии и, следовательно, увеличение рибозонуклеиновой кислоты в плазме клеток наползающего эпителия через 2 суток после нанесения раны. Это не согласуется с данными Н. Ф. Баракиной⁽³⁾ и Р. Цанева⁽¹⁾, наблюдавших резкое увеличение базофилии в плазме клеток регенерирующего эпителия.

Возникающие молодые фибробласты, регенерационные клетки соединительной ткани мыши, отвечают признакам, ранее установленным для регенерационной клетки амфибий⁽¹⁰⁾: большим ядром, отчетливо выделяющимся ядрышком, базофильной, богатой рибозонуклеиновой кислотой плазмой. Ядро, ядрышко и плазма этих клеток показывают сильную активность щелочной фосфатазы, но ни один из этих элементов не вызывает реакции на обнаружение гликогена.

Возможная роль гликогена, фосфатазы и рибозонуклеиновой кислоты при регенерации мной уже рассматривалась⁽¹³⁾. Здесь мне хочется подчеркнуть различие между регенерационной клеткой соединительной ткани аксолотля, животного способного к регенерации внешнего органа, и регенерационной клеткой соединительной ткани мыши, животного, этой способностью не обладающего. В регенерационной клетке соединительной ткани аксолотля в протоплазме присутствует гликоген, а ядрышко не является местом активности щелочной фосфатазы⁽¹³⁾.

В регенерационной клетке соединительной ткани мыши протоплазма не содержит гликогена, а ядрышко, напротив, дает положительную реакцию на обнаружение мест активности фосфатазы.

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

Поступило
7 V 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Р. Цанев, Известия на биологически институт. Болгарская Академия на науките, **2** (1951). ² J. Vrachet, Embryologie chimique, Liège. ³ Н. Ф. Баракина, ДАН, **84**, № 1 (1952). ⁴ H. Clément-Noël, Extrait des Annales de la Soc. Royale Zool. de Belgique, **75** (1944). ⁵ Л. Б. Левинсон, М. Н. Павлова, ДАН, **69**, № 3 (1949). ⁶ Б. В. Кедровский, Усп. совр. биол., **31**, 1 (1951). ⁷ Б. В. Кедровский, Усп. совр. биол., **32**, 3 (6) (1951). ⁸ А. Л. Шабадаш, Проблемы гистохимического исследования гликогена нормальной нервной системы. Медгиз, 1949. ⁹ Г. И. Роскин, Микроскопическая техника, М., 1946. ¹⁰ G. Jasswoin, Zs. f. Mikr. Anat. Forschung, **19**, 4 (1930). ¹¹ Н. А. Шевченко, Арх. анат., гист. и эмбр., **26**, 1, 6 (1941). ¹² Т. М. Яковлева, ДАН, **41**, № 6 (1943). ¹³ Т. М. Яковлева, ДАН, **89**, № 2 (1953).