

Г. И. РОСКИН

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЦИТОХИМИЯ ГЛЮТАТИОНА
В ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ СПИНАЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ
И МОТОРНЫХ КЛЕТКАХ СПИННОГО МОЗГА**

(Представлено академиком А. И. Абрикосовым 5 IV 1954)

В двух предыдущих сообщениях (², ³) было показано, что чувствительные и моторные клетки различаются по целому ряду гистохимических реакций. Вопрос о распределении и содержании глутатиона в этих клетках представляет значительный интерес в связи с ролью глутатиона в процессах метаболизма. Как известно, сульфгидрильные группы занимают важное место в обратимых процессах белков, образующих тканевые структуры. Сульфгидрильные группы входят в состав большого числа клеточных ферментов и в силу этого участвуют в основных процессах обмена веществ (¹). Биохимическая реакция для определения глутатиона была разработана Гопкинсом, гистохимическая — Жуайе-Лавернем (⁴) и затем Жиру и Бюйаром (⁵) и Рапкиным. Но нитропруссидная реакция и ее различные модификации (⁶) не могут удовлетворить исследователя в области гистохимии и гистофизиологии; хотя специфичность этой реакции беспорна, однако срезы ткани должны быть весьма толстыми, что не позволяет решать вопросы тонкой цитологии; красноватое окрашивание, выступающее в клетках и тканях в местах расположения глутатиона, не достаточно ярко и отчетливо, а сохранность клеточных и тканевых структур — несовершенная. Кроме того, надо указать, что препараты очень быстро обесцвечиваются.

По сравнению с нитропруссидной реакцией значительные преимущества имеет относительно недавно предложенная Шевремоном и Фредериком (⁷) гистохимическая реакция. Эти авторы приспособили к задачам гистохимии метод Мазона. Эта реакция выявляет вообще редуцирующие вещества, но Шевремон и Фредерик доказали, что многие вещества этого рода, встречающиеся в клетках и тканях, не дают положительной реакции в данных условиях рН и примененных концентрациях реактивов. Реакцию можно проводить на мазках или на срезах, изготовленных из свежего материала на замораживающем микротоме, или после формалиновой фиксации и заливки в парафин.

Мы проводили реакцию по следующей схеме: 1) Фиксация в формалине (разведенном на физиологическом растворе) в течение 2—3 час.; кусочки ткани должны быть возможно мелкими. 2) Быстрая заливка (в течение 3—4 час.) в парафин. 3) Срезы, наклеенные на предметное стекло, очень тщательно промывают дистиллированной водой для удаления формалина. 4) Срезы проводят последовательно через 3 биологических стаканчика, содержащих смесь следующего состава: 0,1% раствор железосинеродистого калия — 1 часть, 1% раствор $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ — 3 части; реактивы должны быть химически чистыми (для анализа); смесь быстро портится, ее можно хранить 2—3 часа на леднике в склянке темного стекла; при проведении реакции нельзя пользоваться металлическими инструментами; срезы, изготовленные на замораживающем микротоме,

оставляют в реактиве 10—20 мин., а срезы после парафиновой заливки — 20—25 мин. 5) После тщательной промывки водой и докраски азокармином (можно использовать и некоторые другие красители) препараты заключают в бальзам или левулезу. Места распределения SH-групп дают синее окрашивание, диффузное или очень мелкозернистое. Окрашиваются в синий цвет зоны нахождения свободных групп SH, т. е. восстановленного глутатиона. Для выявления тотального глутатиона свежую ткань надо предварительно обработать 10% KCN в течение 5—10 мин. При этом восстановленный глутатион остается без изменения, в то время как окисленный глутатион восстанавливается. После такой обработки можно гистохимически определить распределение и интенсивность реакции на глутатион, пользуясь вышеописанным методом.

Сульфгидрильные радикалы, связанные с протеинами, можно демаскировать, пользуясь трихлоруксусной кислотой. Для этой цели кусочки свежей ткани несколько раз обрабатывают 10% трихлоруксусной кислотой, каждый раз хорошо промывая водой. Затем используют вышеописанную реакцию. Для контроля реакции на глутатион можно предварительно блокировать SH-группы 1% сулемой в течение 30—60 минут, 4% моноиодуксусной кислотой, иодноватокислым калием (KJO_3) или 1% спиртовым раствором хлорпикрина, а затем проделать вышеописанную реакцию: синее окрашивание не наступает. Весьма желательно для контроля и сравнения проводить на тех же тканях реакцию по Жиру или по прописи Паниеля⁽⁹⁾: 1) Изготовить на замораживающем микротоме срезы толщиной в 100 μ , фиксировать срезы в формалине (2—3 часа) и затем быстро залить их в парафин. 2) Срезы (толщиной в 8—10 μ). наклеенные на предметное стекло, обработать в течение 30—60 сек. 5% раствором уксуснокислого цинка. 3) Затем налить на предметное стекло каплю 2% раствора нитропруссидного натрия и одновременно прибавить кристаллик сульфата аммония и каплю раствора аммиака. При этой реакции зоны нахождения восстановленного глутатиона окрашиваются в красноватый цвет. Основные и наиболее характерные картины, которые дает гистохимическая реакция на глутатион в чувствительных клетках спинальных ганглиев и в моторных клетках передних рогов спинного мозга крысы, изображены на прилагаемом рис. 1.

Сопоставляя все наблюдения в целом, можно установить, что моторные и чувствительные клетки заметно различаются как по интенсивности гистохимической реакции на глутатион, так и по ее топографическому распределению. Если принять условное обозначение интенсивности гистохимической реакции в виде +, ++, +++ и ++++, то можно показать, что интенсивность реакции в моторных клетках, как правило (рис. 1, *к, л*) не превышает + или ++. В моторных клетках спинного мозга интенсивность реакции в цитоплазме весьма слаба (+), иногда более интенсивная реакция (++) выпадает в глыбовидных сгущениях цитоплазмы (тигroidные тельца?); ядро же обычно дает более интенсивную реакцию (++); особо надо отметить отчетливую реакцию в зоне ядерной оболочки; в некоторых случаях заметную реакцию на глутатион дает и ядрышко, но и эта реакция по интенсивности не превышает двух крестов.

Совершенно иную картину дают чувствительные клетки спинальных ганглиев. Сравнивая результаты гистохимической реакции в спинальных ганглиях и в спинном мозгу на срезах, расположенных на одном и том же предметном стекле, подвергнутых одной и той же фиксации и обработанных для выявления глутатиона в одних и тех же условиях, можно установить, что чувствительные клетки в подавляющем большинстве дают более интенсивную реакцию (+++, ++++, +++++) то в цитоплазме, то в ядре, или же в ядре и цитоплазме одновременно (рис. 1*а, в, г, з*). Зона распределения глутатиона может охватывать всю цитоплазму целиком (рис. 1 *д*) или же, что гораздо чаще, одна из ее частей

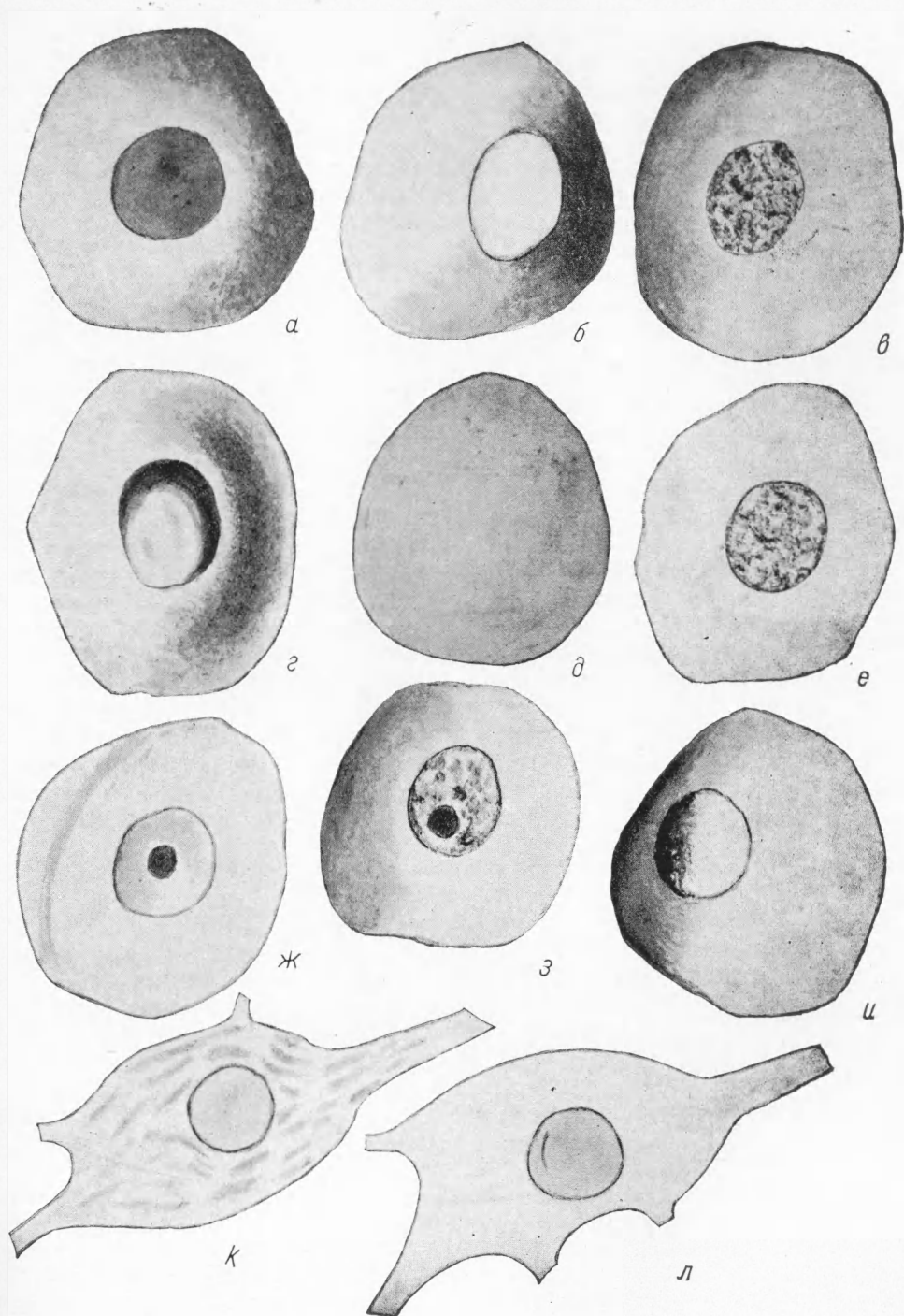


Рис. 1.

дает более интенсивную реакцию, постепенно нарастающую в направлении к одной из сторон клетки (рис. 1а, б, г, з). В ядре глутатион может быть равномерно распределен по всей кариоплазме (рис. 1а) или концентрироваться в одной из частей ядра, или же может быть связан с зернисто-сетчатыми ядерными структурами; наконец, относительно часты случаи, когда ядрышко дает весьма интенсивную реакцию (+++, +++++). Зона ядерной оболочки дает положительную реакцию на глутатион. Весьма интенсивную (+++, +++++) реакцию дают аксоны чувствительных клеток спинальных ганглиев.

Естественно возникает вопрос, какие причины обуславливают разную степень интенсивности реакции на глутатион в разных клетках одного и того же типа и различную топографию зон распределения глутатиона в разных клетках. Сопоставляя все проведенные наблюдения, можно предполагать, что разная интенсивность реакции на глутатион в нервных клетках одного и того же типа зависит от разного функционального уровня клеток, расположенных в пределах одного и того же спинального ганглия. Различная топография зон распределения глутатиона в пределах одного и того же типа клетки может зависеть по крайней мере от двух факторов: 1) от изменений, связанных с действием фиксатора, способного в силу диффузии перемещать распределение глутатиона в пределах цитоплазмы или в кариоплазме; 2) от топографических изменений, связанных с динамикой нормально текущих в клетке физиологических процессов.

Работ по гистохимии глутатиона опубликовано относительно немного, его распределение в тканевых и клеточных элементах изучено недостаточно, еще менее известны функционально обусловленные цитохимические изменения глутатиона. В свое время Жуайе-Лавернь полагал, что глутатион содержится в хондриосомах; по мнению Жиру, глутатион распределен в клетках диффузно и не связан с ее органоидами. По нашему мнению, можно говорить только о зонах распределения глутатиона в клетке, однако гистохимическая реакция в цитоплазме, ядре и ядрышке, как правило, четко разграничена. Мнение Браше⁽⁸⁾ о присутствии глутатиона в кариоплазме находит подтверждение в наших наблюдениях.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
20 I 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Х. С. Коштойац, Белковые тела, обмен веществ и нервная регуляция, 1951.
² Г. И. Роскин, М. В. Шорникова, ДАН, 93, № 2 (1953). ³ Г. И. Роскин, А. А. Жирнова, М. В. Шорникова, ДАН, 96, № 4 (1954). ⁴ P. Joyet, Lavergne, *Protoplasma*, 6 (1928). ⁵ A. Giroud, H. Buillard, *ibid.*, 19 (1933). ⁶ Г. И. Роскин, Микроскопическая техника, 1951. ⁷ M. Chevre-mont, J. Frederic, *Archives de Biologie*, 64 (1943). ⁸ J. Brachet, *Le rôle physiologique et morphogénétique du noyau*, 1938. ⁹ J. Panijel, *Les problèmes de l'histochimie et la biologie cellulaire*, 1951.