Доклады Академии Наук СССР
1954. Том XCIX, № 6

ЦИТОЛОГИЯ

В. А. ШОЛОХОВ и Б. В. КЕДРОВСКИЙ

ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ НЕКОТОРЫХ ОСНОВНЫХ ПРИЖИЗНЕННЫХ КРАСОК К РЕАКЦИИ С АНАБОЛИТАМИ

(Представлено академиком А. И. Абрикосовым 23 X 1954)

Факт образования гранул краски при прижизненном окрашивании был известен давно. Хлопин первый увидел при прижизненном окрашивании животных нейтральной красной сложный процесс накопления в гранулах, кроме краски, некоторых субстанций, названных им «субстанциями кринома» (1). Б. В. Кедровский показал, что при этом процессе происходит отмешивание предсуществующих заранее и важных для обмена веществ клетки кислых коллоидов цитоплазмы, названных им более точно «анаболитами» (2).

В настоящее время установлено, что основной составной частью анаболитов являются рибозонуклеиновые кислоты цитоплазмы (3). До сих пор единственным способом отмешивания анаболитов из свободного (диффузного) состояния в протоплазме в гранулярное был метод прижизненного окрашивания клеток нейтральной красной краской. При этом установлено, что в зависимости от ряда причин (степень концентрации нейтральной красной, продолжительность пребывания животного в краске, возраст животного и т. д.) в гранулы отмешиваются либо все анаболиты цитоплазмы либо только часть их (2).

В настоящем исследовании была поставлена задача испытать другие прижизненные краски с целью определить их способность отмешивать анаболиты в гранулы при прижизненном окрашивании. Были испытаны следующие анилиновые красители: 1) метиленовая синяя, 2) бисмарк коричневый, 3) толуидиновая синяя, 4) сульфат нильской голубой, 5) яркая крезиловая синяя, 6) родамин, 7) пиронин. Эти красители были уже прежде (другими авторами) проверены при прижизненном окрашивании на разных животных и была показана способность их откладываться в цитоплазме гранулярно, за исключением родамина, который дал отрицательные результаты, и пиронина, который не испытывался (4,5). Испытание, проведенное в пробирке, показало способность растворов нейтральной красной, метиленовой синей, сульфата нильской голубой, бисмарка коричневого и родамина к осаждению из раствора ряда белковых веществ и рибозонуклеиновой кислоты (6). Подобного же рода опыты были проведены и позднее, причем также было получено выпадение осадка белка под влиянием ряда прижизненных красителей (7).

Для опытов были взяты головастики Rana temporaria в стадии завершения смены жабер. При нормальных условиях развития их длина к этому периоду достигает 12 мм. Клетки головастиков в этот период развития имеют в протоплазме значительное количество анаболитов, способных при прижизненном окрашивании нейтральной красной отмешиваться в гранулы (2). Головастики в указанный период развития

помещались в растворы испытываемых красок. Для метиленовой синей и бисмарка коричневого была взята концентрация 1 : 50000, для толуидиновой синей, сульфата нильской голубой, яркой крезиловой синей, родамина и пиронина — концентрация 1 : 100000.

Для испытания каждого красителя было проведено по 2 серии опытов по 20 головастиков в каждой со сроками 3 и 5 дней пребывания головастиков в растворах. Каждый раствор через 48 час. сменялся новым, т. е. концентрация краски в растворах, в которых находились головастики, доводилась до первоначального уровня. Фиксация производилась в Ценкер-формоле без уксусной кислоты. Удаление краски из клеток головастиков происходит во время проводки через спирты. Продольные и поперечные срезы головастиков красились в азур II — эозине.

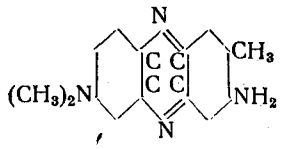
После небольшого срока пребывания в растворах красок подопытные головастики окрашиваются в цвет раствора краски. Наиболее быстро (через 3—5 час.) окрашивание наступает в растворах взятой концентрации: пиронина, сульфата нильской голубой и яркой крезиловой синей. Через больший срок (10 — 12 час.) начинают окрашиваться головастики в растворах метиленовой синей, бисмарка коричневого и толуидиновой синей. Интенсивность окрашивания головастиков увеличивается с повышением срока их пребывания в растворах красок. Наблюдается большая токсичность пиронина, родамина, сульфата нильской голубой, яркой крезиловой синей и толуидиновой синей. В растворах этих красок взятой концентрации наблюдается гибель отдельных головастиков, доходящая к концу опыта до 50% первоначального числа их. В отличие от этих красителей, растворы метиленовой синей и бисмарка коричневого оказываются в течение всего опыта (5 дней) совершенно безвредными для головастиков, несмотря на то, что концентрация их была больше, чем концентрация предыдущих красителей. Наиболее простым и проверенным способом обнаружения анаболитов в клетках животных является окраска гистологических срезов азур II — эозинов. Этот способ был применен для окраски срезов подопытных головастиков. Анаболиты, имеющие кислую реакцию, при этом способе окрашиваются базофильно, т. е. в синий цвет.

В результате просмотра окрашенных азур II — эозином срезов подопытных головастиков всех серий было обнаружено, что цитоплазма всех клеток головастиков окрашена диффузно в синий цвет, подобно тому как окрашены клетки у контрольных животных. Гранул анаболитов даже в виде следов в клетках головастиков всех серий опытов обнаружено не было.

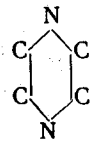
Следовательно, испытанные красители: метиленовая синяя, бисмарк коричневый, толуидиновая синяя, сульфат нильской голубой, яркая крезиловая синяя, родамин и пиронин при прижизненном окрашивании не способны отмешивать анаболиты протоплазмы клеток головастиков из диффузного состояния в гранулярное, подобно тому как это происходит при прижизненном окрашивании животных нейтральной красной. Нейтральная красная реагирует с анаболитами не только в концентрациях, употреблявшихся в наших опытах для перечисленных выше красок, но и в гораздо более сильных разведениях (до 1 : 2000000). Таким образом, в ряду других витальных красителей она занимает особое положение. В опытах в пробирке (6) это отличие не обнаруживается.

Среди основных красок, способных прижизненно окрашивать животные клетки, до сих пор различались 2 группы. Одни из них очень бледно и диффузно окрашивают клеточную плазму, другие концентрируются в гранулах, частью предсуществующих, но преимущественно образуемых клетками заново. Первые оказываются гораздо токсичней вторых, и в этом смысле образование гранул рассматривается обычно

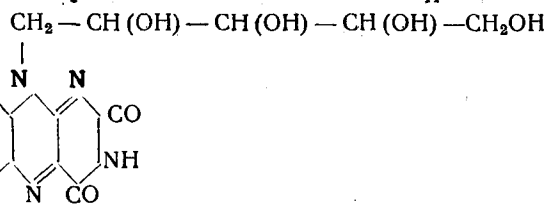
как защитная реакция клеток. Но, как показывают опыты настоящей работы, среди красок второй группы нейтральная красная занимает особое положение, так как только она одна способна к прижизненной реакции с анаболитами, т. е. с соединениями рибозонуклеиновых кислот. Только в этом случае гранулы содержат и краску и анаболиты; при употреблении других красок субстрат гранул не сохраняется на фиксированных препаратах и состоит, повидимому, из веществ другой природы, Особое положение нейтральной красной не зависит от ее физико-химических свойств, так как при реакции с белками и рибозонуклеиновыми кислотами в пробирке все краски второй группы ведут себя приблизительно одинаково. Отличие, следовательно, надо искать в особенностях химической структуры этой краски.



I



II



III

Средняя кольцевая группировка (I), содержащая 2 атома азота, находящихся в молекуле друг против друга, напоминает ядро пиперазина (II), которое, как давно предполагалось (Зелинский, Садиков и др.) и как недавно было показано в лаборатории Н. И. Гаврилова, является составной частью белковой молекулы. Это сходство в молекулярной конфигурации вряд ли случайно. По всей вероятности, нейтральная красная именно потому особым образом реагирует внутри живой клетки, что ее реакция уже предопределена нормальной реакцией обмена веществ — реакцией взаимодействия между нуклеиновой кислотой и некоторой частью белковой молекулы. Молекула нейтральной красной занимает место, принадлежащее в нормальном метаболизме молекуле белка. Возникающий нерастворимый продукт как вещество, чуждое клетке, обособляется в форме гранулы. Такой вывод стоит в связи с современными представлениями об участии нуклеиновых кислот в белковых синтезах, в частности с наблюдениями о расстройстве роста и развития при витальной окраске нейтральной красной ([8–11]).

Еще большее сходство обнаруживается при сравнении формул нейтральной красной (I) и витамина B_2 (рибофлавина, III). Оба соединения относятся к группе диазинов и имеют ядра сходной пространственной конфигурации. По всей вероятности, рибофлавин извлекается клеткой из столь же высоких разведений, как и краска (так, по крайней мере, установлено для другого витамина из этой же группы — для витамина B_1 ([12])). Внутри клетки рибофлавин хотя бы частично превращается в важные ферменты клеточного дыхания — в так называемые флавопротеины, часть которых содержит в составе молекулы адениловую кислоту. Соединение с этой последней легко представить себе как результат непосредственной реакции рибофлавина с частицей рибозонуклеиновой кислоты. По аналогии с действием нейтральной красной можно предположить, что и поступающий внутрь

клетки рибофлавин первично взаимодействует как раз с этой же кислотой.

Внутриклеточная реакция нейтральной красной с анаболитами не может быть случайной и не иметь биологического эквивалента в клеточном обмене веществ. Теоретический анализ наших результатов показывает, что место молекул краски могли бы занимать в обмене веществ молекулы или белка или рибофлавина.

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

Поступило
29 VI 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] N. Chlopin, Arch. exper. Zellf., 4 (1927). [2] Б. В. Кедровский, Биол. журн., 6, № 5—6 (1937). [3] Б. В. Кедровский, Усп. совр. биол., 15, № 3 (1942). [4] Н. Л. Фельдман, ДАН, 59, № 5 (1948). [5] Н. Л. Фельдман, ДАН, 59, № 6 (1948). [6] B. Kedrowski, Zs. f. Zellf. u. microscop. Anat., 15, H. 4 (1932). [7] Н. Л. Фельдман, ДАН, 62, № 6 (1948). [8] Б. В. Кедровский, Бюлл. эксп. биол. и мед., 26, № 1, 62 (1948). [9] Б. В. Кедровский, там же, 25, № 6, 450 (1948). [10] Б. В. Кедровский, ДАН, 61, № 5, 905 (1948). [11] Б В. Кедровский, ДАН, 59, № 9 (1948). [12] М. Н. Мейсель, Функциональная морфология дрожжевых организмов, Изд. АН СССР, 1950.