Доклады Академии наук СССР
1955. Том 101, № 2

БИОХИМИЯ

В. А. ЯКОВЛЕВ и В. В. СОКОЛОВСКИЙ

ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ ТИОЛОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ИМЕЮЩИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ

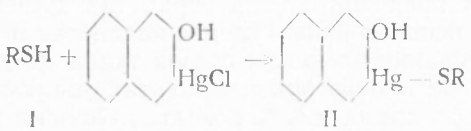
(Представлено академиком Л. А. Орбели 17 XI 1954)

В настоящее время хорошо известно участие тиоловых соединений во многих биохимических процессах в организме животных. Существенную роль при этом играют как белковые вещества, содержащие сульфгидрильные группы, так и более простые по структуре тиоловые соединения (глютатион, коэнзим А и др.). Биохимическими исследованиями в ряде случаев расшифрованы конкретные механизмы участия тиоловых групп этих веществ в биохимических реакциях, протекающих в организме ([1–4]). С другой стороны, исследованиями, главным образом, Х. С. Коштоянца и его сотр. ([5]) установлено значение тканевых SH-групп для осуществления разнообразных физиологических функций организма животного, в том числе функций нервной системы.

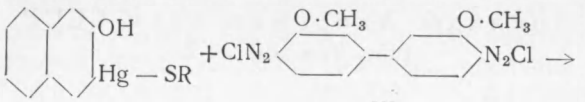
Вместе с тем, до сего времени остаются не расшифрованными конкретные биохимические пути участия тканевых тиоловых соединений в регуляции и непосредственном осуществлении физиологических функций. Исходя из этого, мы считали целесообразным на первом этапе изучения связи между биохимическими реакциями тиоловых соединений и физиологическими функциями исследовать характер локализации тканевых SH-групп, играющих роль в осуществлении физиологических функций.

Естественно, что в целях решения поставленной задачи внимание было обращено на гистохимические методы. Однако попытки применить для этого исследования описанные в литературе гистохимические методы выявления SH-групп оказались безуспешными. Нитропруссидный ([6]) и феррицианидный ([7]) методы не дают устойчивой и достаточно интенсивной окраски, а локализация окрашенных продуктов не всегда точно соответствует распределению SH-групп. При применении метода Беннета ([8]) мы также не смогли получить достаточно сильной окраски препаратов. Удовлетворительные по окраске препараты получаются при работе по методу Барнетта и Зелигмана ([9]), однако этот метод в наших руках оказался не специфичным — срезы ряда тканей с полностью блокированными SH-группами (обработка иодацетатом) давали интенсивную окраску. Указанные обстоятельства привели нас к необходимости разработать новый гистохимический метод выявления тканевых SH-групп.

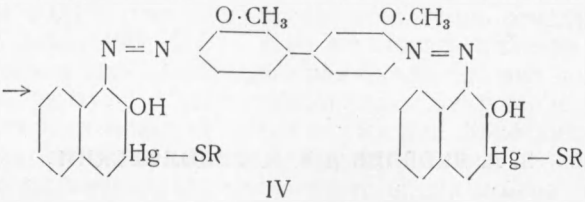
Метод этот основан на следующих реакциях, в которые вступают тиоловые вещества срезов тканей, в результате чего в местах локализации SH-соединений образуется окраска:



I II



III



IV

Тиоловые соединения (I) ткани реагируют с β-оксинафтилмеркурийхлоридом (ОНМХ) с образованием соответствующих меркаптидов (II). После отмывания избытка ОНМХ на срезе производится реакция азосочетания с какой-либо солью диазония; в данном случае ею является бисдиазотированный *о*-дианизидин (III). В результате этих реакций в местах локализации свободных SH-групп, образуется азокраситель (IV).

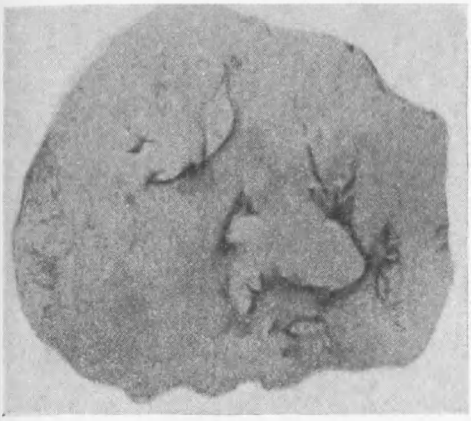
Следует заметить, что от количества SH-групп в том или ином структурном элементе ткани зависит не только интенсивность окраски, но и ее тон, поскольку строение красителя определяется стехиометрическими отношениями II и III. При недостатке II (SH-групп мало) образуется моноазокраситель красного цвета, при избытке II (SH-групп много) образуется бисазокраситель (IV) темнофиолетового тона.

Необходимый для этого метода β-оксинафтилмеркурийхлорид может быть получен по методу, впервые описанному в 1935 г. индийскими авторами ([10]). К раствору 4,3 г β-нафтола в 100 мл 50% этилового спирта прибавляют 15 мл глицерина и при размешивании приливают раствор 8,1 г сулемы в 200 мл 50% спирта. Затем к реакционной смеси постепенно прибавляют раствор 2,5 г $NaHCO_3$ в 200 мл 50% спирта. При этом образуется осадок ОНМХ, которому дают осесть, после чего отсасывают на воронке Бюхнера, промывают разбавленной HCl и затем многократно водой. Сырой продукт кристаллизуют из спирта. При определении температуры плавления продукт темнеет и начинает разлагаться при 180—185°.

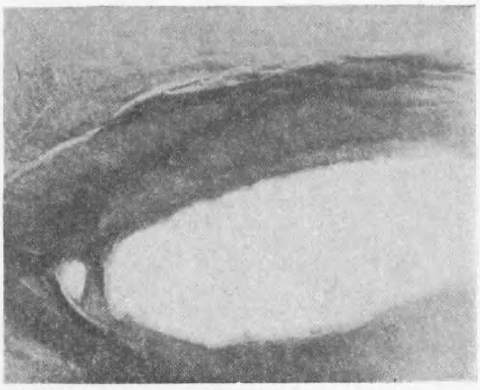
Употребляемый в работе диазораствор готовится непосредственно перед опытом: 50 мг тонкоизмельченного перекристаллизованного *о*-дианизидина всыпают в 10 мл 1% HCl, охлаждают до +1° и при размешивании прибавляют 28 мг $NaNO_2$ в течение 5—6 сек. Раствор быстро фильтруют и, поддерживая температуру не выше + 5°, очень осторожно нейтрализуют сухим $NaHCO_3$ до исчезновения кислой реакции на конго, после чего объем доводят охлажденным 1/15 *М* фосфатным буферным раствором pH 8,2 до 50 мл.

Для выявления общей локализации SH-групп срезы свежей ткани толщиной 30—50 μ, полученные на замораживающем микротоме, помещаются в спиртовый раствор ОНМХ $1 - 1{,}5 \cdot 10^{-3}$ *М* на 1—2 часа, после чего для отмывания избытка реактива помещаются на 30 мин. в спирт, на 20 мин. в одну и еще на 20 мин. в другую порцию ацетона. После промывки в водных растворах ацетона нисходящей крепости и в воде срезы на 2—3 мин. помещаются в холодный диазораствор, затем ополаскиваются в воде, проводятся через спирт восходящей крепости, просветляются ксилолом и заключаются обычным способом в бальзам.

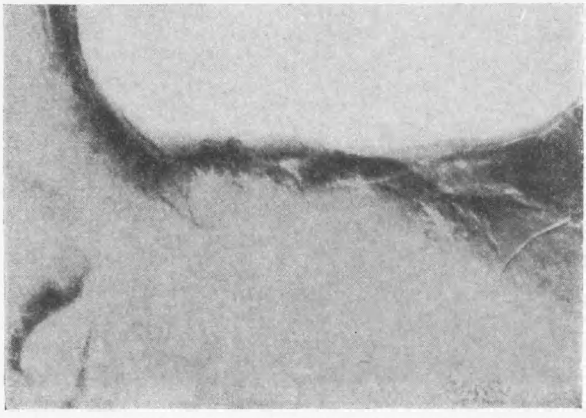
Специфичность гистохимической реакции на SH-группы устанавливалась нами путем предварительной обработки срезов растворами тиоловых ядов (были использованы сулема, иодацетат и аллилизотиоцианат). В этом случае никакие элементы срезов ткани не давали красной окраски. Образующаяся в некоторых элементах микроструктуры обработанных таким образом срезов слабая желтая окраска возникает, как выяс-



а



б



в

Рис. 2. Препараты желудочка сердца лягушки с выявленными SH-группами. *а*—после остановки под влиянием ОНМХ, *б* — после выключения реакции на ацетилхолин под влиянием ОНМХ, *в* — после остановки сердца под влиянием ОНМХ, × 200

нилось, в результате взаимодействия с ними диазораствора. Таким образом, описанная гистохимическая реакция на SH-группы может считаться в достаточной мере специфичной.

При помощи этого метода нами была изучена локализация SH-групп различных тканей животных. В настоящем сообщении будут описаны результаты изучения локализации имеющих функциональное значение SH-групп, полученные в опытах с изолированным сердцем лягушки.

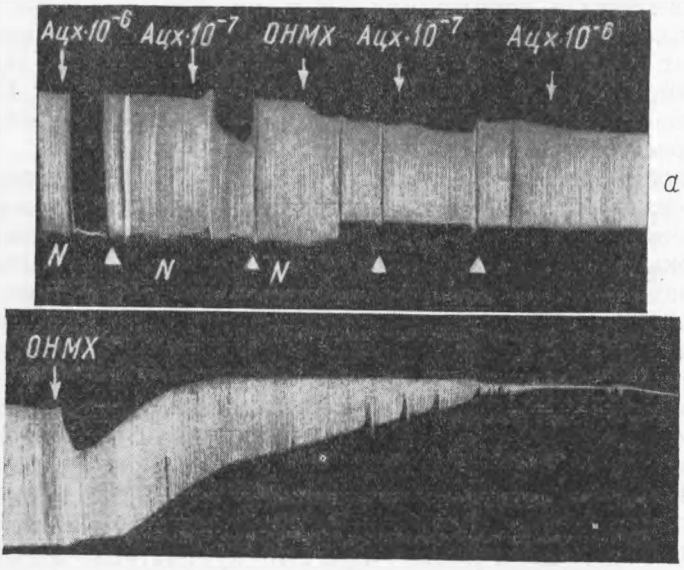


Рис. 1. Действие β-оксинафтилмеркурийхлорида на изолированный желудочек сердца лягушки. *а* — выключение реакции на ацетилхолин, *б* — остановка в стадии систолы

Гистохимическое изучение срезов желудочка сердца лягушки, если его проводить описанным выше методом, показывает наличие SH-групп фактически во всех структурных элементах — срезы относительно равномерно окрашиваются по всей площади. Возникает, однако, вопрос о том, все ли выявляемые SH-группы имеют одинаковое значение для функциональной деятельности сердца.

Из работ Х. С. Коштоянца и Т. М. Турпаева ([11]) известно, что при перфузии в изолированный желудочек сердца лягушки растворов тиоловых ядов происходит нарушение функциональной его деятельности, причем вначале выключается способность сердца отвечать угнетением сокращений на введение ацетилхолина, а дальнейшее действие тиолового яда приводит к угнетению ритмических сокращений и, наконец, к остановке сердца в стадии систолы. В своей работе мы попытались установить при помощи гистохимического метода локализацию тканевых SH-групп изолированного желудочка сердца лягушки, ответственных за обе фазы действия тиоловых ядов. Для этой цели оказалось удобным применить β-оксинафтилмеркурийхлорид в качестве вещества, вызывающего типичные для тиоловых ядов функциональные изменения. Локализация же блокированных ОНМХ тиоловых групп на разных стадиях нарушения функциональной деятельности сердца легко могла быть определена путем последующей обработки срезов ткани сердца диазораствором.

Эксперимент ставился следующим образом: в изолированный по методу, описанному Т. М. Турпаевым ([12]), желудочек сердца лягушки вводился рингеровский раствор, содержащий ОНМХ в концентрации $2{,}5 \cdot 10^{-4}$ *М*. Через определенные промежутки времени этот раствор сме-

нялся на обычный рингеровский раствор и далее на раствор, содержащий ацетилхолин. Если до введения ОНМХ желудочек реагирует на ацетилхолин в концентрации 10^{-6} *М* остановкой, а при 10^{-7} *М* значительным угнетением сокращений (рис. 1 *а*), то через 6 мин. после действия тиолового яда сердце не отвечает на ацетилхолин 10^{-7} *М*, а через 10 мин.— и на концентрацию 10^{-6} *М*. Если время пребывания раствора ОНМХ в сокращающемся желудочке продлить, то удается наблюдать постепенное угнетение и, наконец, прекращение сердечных сокращений (рис. 1 *б*).

Для установления локализации SH-групп, блокированных ОНМХ и ответственных за обе стадии нарушения функциональной деятельности сердца, опыт на соответствующей стадии прекращался и из ткани желудочка на замораживающем микротоме приготовлялись срезы. Срезы указанным выше методом промывались спиртом и ацетоном, обрабатывались диазораствором и заключались в бальзам.

Микроскопическое изучение полученных препаратов показывает, что остановка сердца под влиянием тиолового яда происходит в результате блокирования ничтожной части тканевых SH-групп, причем тех SH-групп, которые локализованы лишь в эндокарде и ближайших к нему мышечных волокнах (рис. 2 *а*). При этом оказалось, что локализация SH-групп, ответственных за первую фазу действия тиолового яда (выключение реакции на ацетилхолин), существенно не отличается от локализации SH-групп, блокирование которых приводит к остановке сердца,— эти SH-группы также расположены в эндокарде и ближайших к нему трабекулах.

Важно отметить, что сульфгидрильные группы, ответственные за ацетилхолиновый эффект, составляют в свою очередь лишь небольшую долю всех тех SH-групп эндокарда, которые блокируются при остановке сердца: срезы, полученные на первой стадии, обнаруживают кирпично-красную окраску эндокарда (рис. 2 *б*), в то время как вторая стадия (остановка сердца) характеризуется фиолетовой окраской эндокарда (рис. 2 *в*).

Полученные в наших опытах результаты говорят о том, что при действии тиолового яда на изолированное сердце сначала блокируются наиболее реактивные SH-группы структур, воспринимающих влияние ацетилхолина (соответственно импульсов блуждающего нерва); при дальнейшем действии тиолового яда блокируются локализованные здесь же менее реактивные SH-группы, ответственные за автоматическую сократительную деятельность.

Поступило
10 XI 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] М. Л. Беленький, В. И. Розенгарт, Усп. совр. биол., **28**, 387 (1949). [2] E. Barron, Adv. Enzymol., **11**, 201 (1951). [3] Z. Bacq, V. Desreux, Exp. ann. bioch. med., 8 sér., Paris, 1948. [4] E. Barron, T. Singer, J. Biol. Chem., **157**, 221 (1945). [5] Х. С. Коштоянц, Белковые тела, обмен веществ и нервная регуляция, М., 1951. [6] F. Hopkins, Biochem. J., **15**, 286 (1921). [7] M. Chevremont, L. Frederic, Arch. Biol., **54**, 589 (1943). [9] H. Bennett, Anat. Record, **110**, 231 (1951). [9] R. Barrnett, A. Seligman, Science, **116**, 323 (1952). [10] P. Neogi, G. Mukherjee, J. Ind. Chem. Soc., **12**, 211 (1935). [11] Х. С. Коштоянц, Т. М. Турпаев, ДАН, **54**, 181 (1946). [12] Т. М. Турпаев, Тр. Инст. морф. животн. им. А. Н. Северцова, в. 6 (1952).