

## ЦИТОЛОГИЯ

В. Е. Козлов

## Прижизненные структуры „оптически пустых“ ядер

(Представлено А. Л. Тахтаджяном 2 VII 1953)

В последнее время в цитофизиологической литературе распространяется представление о гомогенности ядра и плазмы живых клеток в интеркинезе (П. В. Макаров (2-6)). Это учение о гомогенности живого вещества основывается на факте ненаблюдаемости микроструктур на большинстве живых объектов, при применении обычных способов микроскопирования—в светлом и темном полях (П. В. Макаров (4,5)). Однако возможности выявления прижизненных структур в клетке ни в коем случае нельзя считать исчерпанными этими способами наблюдения.

В нашу задачу входило показать на наиболее трудном объекте—ядре овоцита лягушки—наличие прижизненных структур. Известно, что живое ядро этого объекта в „покоящемся состоянии“ при светлом и темнопольных наблюдениях представляется „оптически пустым“, в то же время на фиксированных препаратах такое ядро обнаруживает большое количество морфологически различных структур.

В предлагаемой работе, для выявления прижизненных структур была применена позитивная фазо-контрастная установка. Метод фазо-контрастной микроскопии является наиболее совершенным из ныне существующих методов наблюдения неконтрастных объектов. Применяя этот метод к нашему объекту, пришлось убедиться, что в живой клетке ядро и плазма взаимно маскируют друг друга. Для преодоления этого препятствия было решено воспользоваться методом микроизоляции ядер. Исследовались изолированные ядра овоцитов *Rana temporaria* на третьем году их развития. Выделение ядер производилось специальными иглами в физиологический раствор Рингера.

Для получения сравнимых результатов прижизненных наблюдений с наблюдениями постоянных препаратов часть выделенных ядер была фиксирована по Навашину, обычным путем доведена до парафина и микротомные срезы, толщиной в 10 мк, окрашены гематоксилином Гейденгайна и по Фельгену. Эти препараты исследовались и фотографировались на обычном светлопольном микроскопе.

Извлеченное ядро имеет вид нежного, прозрачного пузырька. Во избежание травматического повреждения, наблюдения ядер производились на том же самом стекле, на которое оно выделялось, без покровного стекла и, как уже говорилось, в капле физиологического раствора. Исследование велось с помощью фазо-контрастных объективов  $40\times 0,65$  и при темнопольных наблюдениях—ахроматом той же характеристики. Наилучшие результаты дали при микрофотографировании комбинации этих объективов со стократным окуляром.

Для установления сохранности жизненных свойств выделенных ядер применялось окрашивание их нейтральным красным в Рингеровском растворе и исследование их в темном поле при помощи кордионд конденсора и экспериментальный анализ.

Нейтральным красным выделенное ядро красится очень слабо. После воздействия на ядро такими повреждающими агентами как 0,001% раствор молочной кислоты, 0,001% раствор уксусной кислоты и воздействия температуры в  $30^{\circ}$  оно начинает интенсивно диффузно прокрашиваться.

В темном поле выделенное ядро выглядит оптически пустым, за исключением обнаруживаемых (не всегда) краевых нуклеолей и легкого свечения ядерной оболочки. В случае повреждения травматическими, термическими, химическими агентами можно наблюдать сначала только легкое помутнение ядра, а потом—сплошное его свечение.

На основании наблюдений можно утверждать, что ядро после выделения из клетки оставалось живым. Если и имеется денатурация белковых тел в выделенных ядрах, то она незначительна и укладывается в представление о спонтанной денатурации.

Если все предосторожности при извлечении ядра соблюдены, то оно в течение 2 часов не проявляет никаких признаков повреждения. После 2 часов обычно уже удается наблюдать усиление прокрашивания ядра нейтральным красным и усиление его свечения на темном поле.

Следует заметить, что при повреждении выделенного ядра, а также в случаях повреждения при извлечении его из клетки, не удавалось наблюдать ни в светлом, ни в темном поле появления каких-либо определенных структур, кроме нуклеолей, видимых обычно и без применения каких-либо воздействий.

Исследование структур выделенных ядер при помощи фазо-контрастного микроскопа проводилось с учетом сохранения их жизненных свойств сплошь и рядом в растворе нейтрального красного в Рингеровском растворе. При этом наблюдались ядра в течение первого часа по их выделению.

Фазо-контрастная микроскопия выявила следующие нормальные структуры ядер овоцитов:

1) оболочку ядра, толщина которой может значительно варьировать: при проколе ядра жидкая кариоплазма вытекает из ядра, оболочка ядра образует складки и спадается;

2) дифференцировку кариоплазмы на две зоны: краевую, более темную, с нуклеолями, лежащими в ней, и центральную („внутреннее тело“ Борна), в которой находятся зернышки одинакового размера, несомненно соответствующие зернышкам („körnchen“) Борна и обнаруженным и на постоянных препаратах Иоргенсоном и Вагнером, и, наконец,

3) хромосомы.

Краевые нуклеоли многочисленны и собраны иногда в виде цепочек, как это наблюдается и на постоянных препаратах. Размер краевых нуклеолей у различных овоцитов очень сильно варьирует, варьирует он и в пределах одного и того же овоцита. Сосредоточены этого типа нуклеоли в краевой зоне кариоплазмы, а в центральной зоне они встречаются редко.

„Зернышки“ приблизительно одинакового размера являются весьма определенной структурой ядра овоцита лягушки. Они образуют скопления овальной формы и расположены в этом скоплении на приблизительно одинаковых расстояниях друг от друга. Во „внутреннем теле“ скопление „зернышек“ располагается несколько эксцентрично.

Хромосомы, имеющие вид нежных нитей, отчетливо выделяются на фоне кариоплазмы, но на фазо-контрастной фотографии выходят гораздо более бледно, чем нуклеоли и цепочки нуклеолей. Последнее обстоятельство с несомненностью свидетельствует о другом химическом составе, нежели нуклеоли, и о чрезвычайной близости показателя преломления хромосом к показателю преломления кариоплазмы. Это свидетельствует также и о том, что хромосомы, имеющие при этом способе наблюдения отчетливо видимое хромомерное строение, произошли не путем сцепления „зернышек“ или других структур ядра, что впрочем следует и из известного факта бедности ядра овоцита тимо-нуклеиновой кислотой.

На постоянных препаратах хромосомы сохраняют, хотя и менее отчетливое, хромомерное строение.

Кроме краевых нуклеолей и скоплений „зернышек“ одинакового размера, расположенных в различных зонах кариоплазмы, по всей кариоплазме можно наблюдать мельчайшие частицы, находящиеся в броуновском движении. В выделенном ядре в движении находятся не только эти частицы, но и нуклеоли и хромосомы. Движение структурных элементов ядра заставило применять при микрофотографировании мощный источник света—ртутную лампу ПРК-4, ультрафиолетовая часть спектра изучения которой устранялась светофильтром, нацело убравшим ультрафиолетовые лучи от  $\lambda$  366  $\mu$  и короче. Применение такого светофильтра диктовалось необходимостью устранить ту часть ультрафиолетового излучения, для которой стекло является прозрачным, и тем самым устранить возможное повреждающее действие этого излучения. Несмотря на столь мощный источник света, движение структурных элементов ядра заставляло производить микрофотографии с

заведомой недодержкой и, затем, контратипировать негатив, что, естественно, усиливало контрастность фотографий.

При действии повреждающих агентов не удавалось получить таких изменений, которые вели бы к искусственному образованию вышеописанных структур. В результате ряда опытов удалось убедиться, что повреждающие агенты ведут не к структуризации ядер, а к нарушению нормальных структур.

Обычные цитофизиологические эксперименты по паранекротическим явлениям, в результате особенностей методики проведения этих экспериментов, вызывают разнообразные структуры патологического характера, которые частично маскируют или делают совершенно невозможным одновременное наблюдение тонких нормальных структур у ядра и плазмы.

Отдельные эксперименты показывают, что при действии раздражающих и повреждающих клетку воздействиях возможна и такая смена фаз, которая нацело маскирует плазменные и ядерные структуры, и такая, которая подчеркивает имеющиеся в норме структуры. Это может приводить сторонников отсутствия прижизненных структур клетки к представлению о появлении их в момент повреждающего действия агентов.

Например, в работе Александрова и Александровой (1) приводятся данные о витальном наблюдении клеток эпидермиса, содранного с *glutae* цветка злаков. Препарат исследовался в капле водопроводной воды.

Тотчас же после сдираания содержимое клеток представлялось совершенно гомогенным—не отличалось даже ядро от окружающей его плазмы—лишь вакуоли, буде они имелись, нарушали гомогенность.

Через некоторое время в клетке становились различимы границы ядра, а немного спустя в плазме отчетливо различались ее органоиды; т. е. в этом опыте наблюдался полный параллелизм с явлениями, описанными П. В. Макаровым (2). Последним из этого наблюдения был сделан вывод об отмирании клетки и, как следствие отмирания ее (клетки) структуризация. Отсюда был сделан и обобщающий вывод о гомогенности живой клетки и о структуризации ее лишь под влиянием повреждающих агентов.

В опыте Александрова и Александровой появление структур сопровождалось восстановлением плазменных токов, которые у этого объекта очень быстры, т. е. клетка возвращалась к нормальной жизнедеятельности после повреждения при сдираании эпидермиса и восстанавливалась наблюдаемость прижизненно существующих в ней структур. При отмирании клетки в ней сохранялись все ранее наблюдавшиеся структуры. Явление гомогенизации клетки при повреждении было названо авторами „шоком“, ранее известное в цитологической литературе под названием „желатинизации“. Что в опытах П. В. Макарова им наблюдались „шокированные“ клетки эпидермиса чешуи лука, говорит тот факт, что течений в плазме клеток П. В. Макаров не

наблюдал, а они (течения) имеются в этих клетках и легко обнаруживаются через известный промежуток времени после сдиранья эпидермиса.

Восстановление наблюдаемости внутриклеточных структур говорило о возвращении клеток к нормальной жизнедеятельности, но автором выше цитированных работ был сделан диаметрально-противоположный вывод о якобы наблюдавшемся отмирании клеток.

Наблюдения над ядром овоцита лягушки были дополнены наблюдениями над ядром диатомовой водоросли *Nitzschia sigmaidea*. На этом объекте было легко удостовериться в жизнеспособности клетки.

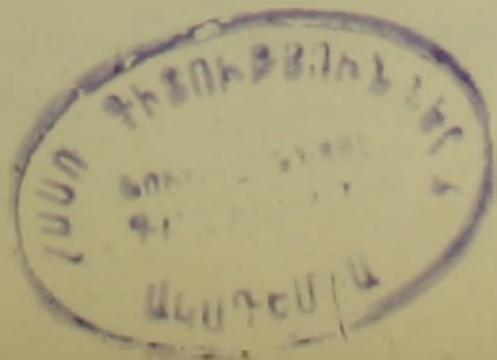
В том, что диатомея жива, убеждала ее подвижность, а коричневый цвет хроматофоров свидетельствовал о ее неповрежденности (при повреждении хроматофоры зеленеют). Наконец, за то, что клетка не находилась в периоде деления говорило время года (ноябрь); наблюдения велись сразу же по извлечении диатомей из-под льда пруда. Фазо-контрастные наблюдения и микрофотография отчетливо показали структуризованность ядра. Эти структуры напоминали спиремму. При свето- и темнопольных наблюдениях ядро выглядело „оптически пустым“.

На основании вышеизложенных наблюдений и результатов этой работы, следует очень осторожно относиться к явлению оптической пустоты „покоящихся“ ядер живых клеток при обычных методах микроскопии и к явлению „возникновения“ структур при любых раздражающих и повреждающих клетку воздействиях.

Настоящая работа предпринята лишь с целью доказать положение о постоянном наличии микроструктур в живом и неповрежденном ядре, микроструктурной гетерогенности ядра. Эта работа отнюдь не снимает вопросов о генезисе микроструктур, поднятого в последнее время П. В. Макаровым, тем более, что работы самого П. В. Макарова не проливают света на этот процесс. Указанные работы касаются лишь перераспределения тимо-нуклеиновой кислоты в „покоящемся состоянии“, интерфазе и митозе. Совершенно не освещенной остается судьба хромонемы—белковой „скелетной“ нити, представляющей остов хромосомы, на котором в течение митоза временно конденсируется тимо-нуклеиновая кислота. А исследование процесса образования хромонемы только и может пролить свет на этот вопрос.

Приводимые в другой работе П. В. Макарова (5) данные о высасывании микропипеткой содержимого интерфазного ядра, свидетельствующие, по автору, об отсутствии твердого остова хромосом, не могут быть приняты в доказательство, так как белковая нить (хромонема) поперечник которой равен долям световой волны, естественно, не могла оказать заметного влияния на текучесть капли, как это, впрочем, следует и из данных этой работы.

В заключение считаю приятным долгом принести благодарность за оказанную в ходе работы консультацию проф. И. И. Соколову.



«Օպտիկապես դատարկ» կորիզների կենդանուրյան ժամանակվա ստրուկտուրաները

Վերջերս ցիտոֆիզիոլոգիական զրականության մեջ տարածված է այն կարծիքը, որ կենդանի օրջի կորիզը և պլազման հոմոգեն են: Այս աշխատանքով հեղինակը ցույց է տալիս, որ կենդան և չփնասված կորիզը միշտ հայտնաբերում է կառուցվածքային տարրեր, այսինքն միկրոստրուկտուրապես հետերոգեն է: Դիտողությունները կատարված են չափազանց դժվար օբյեկտի՝ զորտի (*Rana temporaria* օոցիտի կորիզի վրա: Մեկուսացված կորիզների ստրուկտուրաների ուսումնասիրությունը կատարված է ֆազոկոնտրաստ միկրոսկոպով կորիզների կենսունակության պահպանման պայմաններում՝ չեզոք կարմիրի և Ռինդերյան յուծույթի միջոցով:

Գորտի օոցիտի մեկուսացված կորիզը, որը «հանգստի շրջանում» լուսավոր և մութ տեսողական դաշտերի դեպքում օպտիկապես դատարկ է երևում, նույն այդ կորիզը ֆիքսված պրեպարատներում մեծ թվով մորֆոլոգիապես տարբեր ստրուկտուրաներ է ի հայտ բերում: Ֆազոկոնտրաստ ապարատի միջոցով օոցիտների կորիզում հայտնաբերված են հետևյալ ստրուկտուրաները.

1) կորիզի թաղանթը, 2) կարևորպլազմայի եզրային և կենտրոնական շերտերը, 3) քրոմոգոմները: Փորձերը ցույց են տալիս, որ օրջում գրգռող և փնասվածքներ առաջացնող ներգործությունների հետևանքով, հնարավոր են ֆազերի այնպիսի փոփոխություններ, երբ պլազմային և կորիզային ստրուկտուրաները քողարկվում են և այնպիսիները, որոնց դեպքում նորմալում եղած ստրուկտուրաներն ընդգծվում են: Այս հանգամանքը կարող է կորիզում կենսական ստրուկտուրաների բացակայության կողմնակիցներին բերել այնպիսի պատկերացման կենսական ստրուկտուրաներ, որ առաջանում են փնասող գործոնների երևան գալու մոմենտին: Վնասող գործոնների ներգործության դեպքում, հեղինակը չի ստացել այնպիսի փոփոխություններ, որոնք տանելին վերը հիշված ստրուկտուրաների առաջացմանը: Մի շարք փորձերի արդյունքներից հեղինակը գալիս է այն համոզման, որ փնասող գործոնները տանում են ոչ թե դեպի կորիզների ստրուկտուրիզացիան, այլ դեպի նորմալ ստրուկտուրաների իանգարումը:

Գորտի օոցիտի վրա կատարված դիտողությունները լրացվում են դիատոմային ջրմուռի (*Mitroschia sigmoidea*) կորիզի նկատմամբ կատարված դիտողություններով: Աշխատության մեջ հեղինակը բերում է նաև 9 միկրոֆոտոնկարներ նկարահանված՝ 1) լուսավոր ու մութ տեսողական դաշտում և 2) ֆազակոնտրաստ միկրոսկոպով:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

1 В. Г. Александров и О. Г. Александрова, ДАН, 29, № 3, 1940. 2 П. В. Макаров, Бюлл. эксп. биол. и мед. 9 (1944). 3 П. В. Макаров, ДАН, 47, № 2 (1945). 4 П. В. Макаров, ДАН, 54, № 1 (1946). 5 П. В. Макаров, ДАН, 54, № 2 (1946). 6 П. В. Макаров, Вестн. Лен. университета, № 2, 63 (1948).