

А. Л. ШАБАДАШ, М. А. РОСТОМЯН

ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ НУКЛЕОПРОТЕИДОВ В КЛЕТКАХ МОЗГОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКОВ В РАННИЕ СРОКИ ПОСЛЕ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ

Известно, что облучение животных ионизирующей радиацией вызывает быстрые ответные реакции гипофиз-адреналовой системы [1].

До недавнего времени основным морфологическим критерием радиобиологических поражений служили сравнительно грубые патогистологические признаки повреждения клеток (пикноз или распад ядер, вакуолизация цитоплазмы и т. д.), типичные для отдаленных сроков после воздействия. Новые цитохимические методы [3, 4], характеризующие некоторые физико-химические свойства нуклеопротеидов важнейших клеточных органелл, позволяют судить о ранних нарушениях деятельности клеток при отсутствии обычных патогистологических признаков поражения. Выявленные этими методами реактивные изменения нервной системы, наступающие в первые минуты после ионизирующего облучения, доказали несостоятельность утверждений о ее радиорезистентности, показав участие головного и спинного мозга в лучевом поражении [5—8]; в настоящее время эти результаты подтверждены также рядом других методов [1, 2]. Международная конференция по проблеме «Действие ионизирующей радиации на нервную систему» (1962) признала, что наиболее значимым результатом радиобиологических исследований последнего времени является доказательство быстро возникающих реактивных изменений в клетках нервной системы [11].

Мозговое вещество надпочечника содержит наряду с хромоаффинными и нервными клетками; эти оба типа клеток являются дериватами эмбриональных невробластов, которые дифференцировались по различным тканевым профилям; важно и своевременно уточнить характер их радиобиологической реактивности.

В настоящей работе приводятся результаты цитохимических исследований нуклеопротеидов в хромоаффинных и интрамуральных нервных клетках мозгового вещества надпочечника взрослой крысы после действия ионизирующего облучения. Различная специализация клеток обоих типов отобразилась в неодинаковом ходе ответных реакций.

Материал и методы

Исследования проведены на белых крысах-самцах линии Вистар, после однократного общего гамма-облучения в дозе 1000 р (аппарат ГУПОС, источник облучения цезий 137, мощность дозы 700 р/мин., экс-

позиция 1 минута 26 секунд). Материал был фиксирован в различные сроки после облучения: через 1, 10, 20, 30, 60 минут, 3 часа, 1, 2, 3, 4 суток; на каждый срок использовано от 3 до 8 животных; контролем служили интактные животные; кроме того, была поставлена специальная серия опытов с минимым облучением для выявления побочных реактивных изменений, которые могли возникнуть под влиянием самих условий опыта (помещение животных в контейнер для облучения и т. п.). Весь материал фиксирован прижизненно: вслед за вытеснением крови 1,12% раствором азотнокислого натрия или 7% раствором глюкозы у оглушенного эфиром животного производилась инъекция нейтральной фиксирующей смеси Шабадаша в кровяное русло (1,8 г азотнокислой меди и 0,9 г азотнокислого кальция в 100 мл 96° спирта; непосредственно перед инъекцией к этому раствору добавляли формалин в отношении 10:1). После перфузии брюшной полости (примерно 200 мл фиксатора) надпочечник вырезали и дофиксировали 18—20 часов в том же растворе фиксатора, отмывали 2—3 дня в часто сменяемых порциях 96° спирта, обезжировали и заливали в парафин. Препараты приготавливали из серийных срезов толщиной в 5 μ , приклеенных 30° спиртом на обезжиренных предметных стеклах.

Выявление рибонуклеопротеидов (РНП) в органоидах хромаффинных и нервных клеток надпочечника проводили избирательной сорбцией метиленового синего в забуференных растворах от рН 2,8 до 4,6 с интервалом в 0,2 ед. рН (0,1 М фосфатный, бифталатный и ацетатный буферы). Этот гистохимический метод позволяет дифференцированно выявлять различные РНП, локализованные в конкретных органоидах клетки и отличающиеся своими физико-химическими особенностями, в частности, их изоэлектрическими точками (ИЭТ), при которых сорбция красителей практически отсутствует [3, 4]. Конкретные показатели ИЭТ и их изменения являются чувствительным индикатором реактивного состояния клетки [5, 8, 10].

Результаты исследований

Результат цветной гистохимической реакции на РНП в последовательно варьирующем ряду значений рН локализуется в митохондриях, в ядре и ядрышке хромаффинных клеток мозгового вещества надпочечника. Окрашенные по этому методу митохондрии в норме имеют округлую форму и равномерно располагаются в цитоплазме (рис. 1, 2). РНП митохондрий хромаффинных клеток у нормальных животных выявляются в широком диапазоне значений рН, их ИЭТ располагаются в зоне от рН 3,6 до 4,6 (в среднем 4,0).

ИЭТ ядер хромаффинных клеток располагаются в зоне рН 3,0—3,2 (в среднем 3,1), ядрышек — при рН 3,0—3,6 (в среднем 3,3).

Наряду с хромаффинными клетками в мозговом веществе надпочечников тот же метод выявляет и нервные клетки, входящие в состав интрамурального ганглия (рис. 3). РНП митохондрий нервных клеток ха-

рактически более узкими границами выявления их ИЭТ в зоне от рН 2,8 до 3,4, что в среднем соответствует рН 3,1; преобладающая форма митохондрий после окраски в оптимальных значениях рН,—округлая (рис. 4), что может быть расценено как признак их функциональной активности [9]. В связи с тем, что выявление РНП митохондрий нервных и хромаффинных клеток происходит при различных значениях рН, оптимальная окраска их в хромаффинных клетках сопровождается маскировкой митохондрий нервных клеток общей закраской цитоплазмы, что видно на рис. 2.

У животных после мнимого облучения ИЭТ РНП митохондрий хромаффинных клеток выявляются в зоне рН 3,6—4,0 (в среднем 3,8), ИЭТ ядер располагаются в зоне 2,8—3,0 (в среднем 2,8), ядрышек—от рН 2,8 до 3,2 (в среднем 3,0), т. е. ИЭТ органондов хромаффинных клеток после мнимого облучения несколько смещены в кислую сторону по сравнению с нормой. В то же время ИЭТ РНП митохондрий нервных клеток выявляются в зоне рН 2,8—3,4 (в среднем 3,15), т. е. остаются практически без изменения.

Средние значения ИЭТ органондов нервных и хромаффинных клеток приведены в табл. 1. В табл. 2 даны абсолютные величины сдвига ИЭТ, выраженные в единицах шкалы рН по отношению к исходным величинам.

Таблица 1
Средние значения ИЭТ РНП органондов интрамуральных нервных и хромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников крыс после гамма-облучения (1000 р)

Органонды	Норма	Мнимое облучение	1 мин.	10 мин.	20 мин.	30 мин.	60 мин.
Митохондрии нервных клеток . . .	3,1	3,15	3,45	3,0	3,3	3,3	3,5
Митохондрии хромаффинных клеток . . .	4,0	3,8	4,05	3,3	3,3	3,5	4,1
Ядро хромаффинных клеток	3,1	2,8	3,2	3,3	3,0	3,3	3,2
Ядрышко хромаффинных клеток . . .	3,3	3,0	3,3	3,25	3,1	3,3	3,4

Таблица 2
Величина сдвига ИЭТ РНП органондов интрамуральных нервных и хромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников крыс после гамма-облучения (1000 р)

Органонды	Мнимое облучение	1 мин.	10 мин.	20 мин.	30 мин.	60 мин.
Митохондрии нервных клеток	0,05	0,35	0,1	0,2	0,2	0,4
Митохондрии хромаффинных клеток	0,20	0,05	0,7	0,7	0,5	0,1
Ядро хромаффинных клеток	0,3	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1
Ядрышко хромаффинных клеток	0,3	—	0,05	0,2	—	0,1

Эти изменения, выраженные графически, представлены на рис. 7, 8. Как видно из таблиц и графиков, при кратковременном «физиологическом» воздействии (тревога при мнимом облучении) в хромаффинных клетках можно наблюдать сдвиг ИЭТ РНП органондов в кислую сторону; при этом большой разброс ИЭТ РНП митохондрий хромаффинных клеток, наблюдаемый у животных в норме, сменяется довольно узкой изоэлектрической зоной от рН 3,6 до 4,0 после мнимого облучения; по-видимому,

помещение в контейнер и другие манипуляции вызывают некоторую стрессовую реакцию, при которой, как известно, происходит усиленный выброс и синтез катехоламинов. Оба признака — ограничение зоны ИЭТ и кислотный сдвиг среднего значения рН — типичны только для хромаффинных клеток.

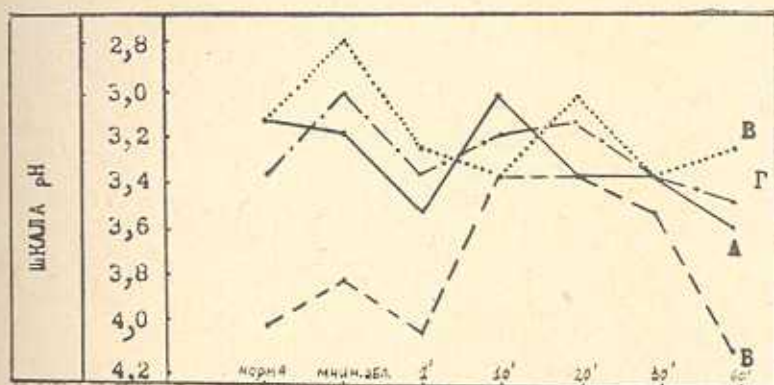


Рис. 7. Кривая А — средние значения ИЭТ РНП митохондрий нервных клеток, Б — митохондрий хромаффинных клеток, В — ядер хромаффинных клеток, Г — ядрышек хромаффинных клеток.

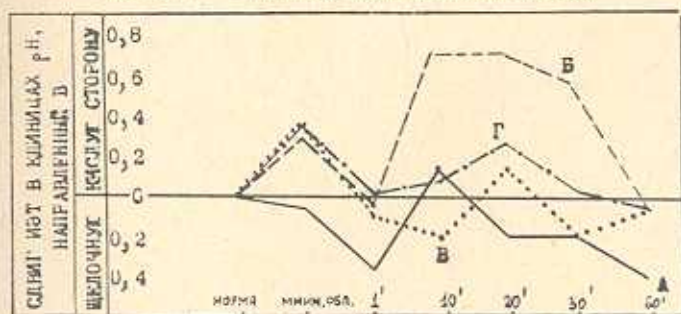


Рис. 8. Кривая А демонстрирует сдвиг ИЭТ РНП митохондрий нервных клеток, Б — митохондрий хромаффинных клеток, В — ядер хромаффинных клеток, Г — ядрышек хромаффинных клеток.

В нервных клетках мозгового слоя надпочечников после мнимого облучения существенных изменений нет: сдвиг ИЭТ РНП митохондрий составляет в среднем лишь 0,05 ед. рН в сторону защелачивания, и достоверность этих изменений мала. При анализе изменений, наступающих в первые минуты после ионизирующего облучения, следует учитывать суммацию процессов, возникающих в результате действия обоих факторов: общих неспецифических стрессовых условий опыта и действия радиации. Так, например, ИЭТ РНП митохондрий, ядрышка и ядра хромаффинных клеток через 1 мин. после облучения близки к показателям у нормальных животных; однако при сопоставлении их с показателями, наблюдаемыми при мнимом облучении, выявляется некоторое «защелачивание» РНП структур хромаффинных клеток, составляющее для митохондрий 0,2 ед. рН, для ядра—0,4 ед. рН, для ядрышка—0,3 ед. рН.

Следовательно, реакция компонентов хромаффинных клеток на «физиологический» раздражитель и действие ионизирующего излучения имеет неодинаковый характер: в первом случае возникает некоторое закисление структур, во втором — их относительное защелачивание и, как результирующая, близкий к норме средний показатель ИЭТ.

Иначе протекают реактивные процессы в нервных клетках, расположенных в толще хромаффинной ткани надпочечника: через 1 мин. после облучения происходит отчетливое смещение ИЭТ РНП митохондрий в щелочном направлении, причем сдвиг (при сопоставлении средних величин) составляет 0,4 ед. шкалы рН. Помимо наблюдаемого сдвига ИЭТ, в нервных клетках у некоторых животных обнаруживались также и изменения размеров митохондрий, их удлинение (рис. 5). Таким образом, через 1 мин. после действия ионизирующего излучения сдвиги ИЭТ РНП митохондрий интрамуральных нервных клеток надпочечника выражены резче, чем в хромаффинных клетках, а у части особей сопровождаются и более глубокими морфологическими изменениями. Следовательно, реакция нервных элементов опережает процессы в расположенных рядом хромаффинных клетках, в которых изменения возникают несколько позднее.

Динамика изменений ИЭТ в органоидах обоих исследуемых типов клеток мозгового вещества надпочечника имеет фазовый, волнообразный характер: если через 1 мин. после облучения наиболее выраженные физико-химические изменения наблюдаются в нервных клетках, то через 10 мин. в эти процессы включаются и хромаффинные клетки надпочечника, в митохондриях которых возникает значительный сдвиг ИЭТ в кислую сторону (в среднем на 0,7 ед. рН). Как указано выше, тенденция к закислению гранулярных структур вообще типична для хромаффинных клеток. ИЭТ РНП митохондрий нервных клеток к этому времени возвращается к норме или немного смещается в кислую сторону, и через 10 мин. наряду с округлыми митохондриями встречаются удлиненные формы (рис. 4). На 20 мин. в нейронах возникает вторая волна щелочного сдвига ИЭТ РНП митохондрий на фоне резкого закисления в митохондриях хромаффинных элементов. Через 30 мин. после облучения начинается постепенное возвращение ИЭТ митохондрий хромаффинных клеток к средним значениям нормы, к которым они приближаются к 60 мин.; удлиненные митохондрии встречаются только в единичных клетках; ИЭТ ядрышка и ядра также близки к нормальным показателям. Однако в нервных клетках подобной «компенсации» не наблюдается. Как указано выше, вслед за кратковременной нормализацией ИЭТ митохондрий к 10 мин. возникшая вторая волна щелочного смещения к 60 мин. достигает 0,4 ед. рН, что характеризует значительные изменения органоидов нервных клеток.

Через 3 часа после облучения ИЭТ гранулярных компонентов хромаффинных клеток вновь сдвигается в кислую сторону от нормы; ИЭТ митохондрий нервных клеток в эти сроки несколько «нормализуются», соответствуя в среднем рН 3,3, тогда как через 24 часа снова наблюдает-

ся щелочной сдвиг. Через 2 суток после воздействия в большинстве хромаффинных клеток наблюдаются как удлинённые, так и округлые митохондрии, обнаруживаемые в очень широких пределах значений рН, от 3,4 до 4,4; на третьи сутки они обнаруживаются и при рН 3,2; в нервных клетках РНП митохондрии явно «защелочены» и выявляются в зоне 3,4—3,8.

В пределах 48 часов после облучения существенных изменений ИЭТ в ядрышке и ядре хромаффинных клеток не обнаружено; но через 72 часа их ИЭТ сдвигаются в щелочную сторону и выявляются в зоне рН 3,4—3,8. На третьи и четвертые сутки, помимо наблюдаемых сдвигов физико-химических показателей, становятся отчетливыми изменения и морфологического порядка: сильно увеличиваются и несколько вакуолизируются ядра, в цитоплазме появляются крупные базофильные включения и т. д.

Таким образом, гистохимическое исследование реактивных изменений РНП структур клеток мозгового вещества после действия ионизирующего излучения установило, что наиболее чувствительными к облучению являются невроны, в которых немедленно, т. е. в первые же минуты, происходят значительные сдвиги ИЭТ РНП митохондрий; эти изменения аналогичны процессам, выявленным в нервных клетках различных отделов центральной нервной системы [6, 7]. Сопоставление сдвигов в важнейших «метаболических» органоидах нервных и хромаффинных клеток — митохондриях, которые являются тонкими показателями функционального состояния клетки, выявило характерную последовательность вовлечения в ответную реакцию нервных и хромаффинных клеток, несмотря на их эмбриологическое родство и топографическое соседство в одном и том же органе.

В ы в о д ы

1. Динамика изменений ИЭТ-РНП различных органоидов клеток мозгового вещества надпочечника крыс после облучения имеет волнообразный характер и тонко отражает ход биологических реакций; последовательные фазы гистохимических реакций характеризуют степени обратимых вначале, а затем необратимых процессов.

2. Первыми на действие ионизирующего излучения реагируют РНП митохондрий интрамуральных нервных клеток надпочечника, вслед за которыми — спустя 10 мин. — в реакцию включаются РНП митохондрий хромаффинных клеток.

3. Реакция хромаффинных клеток мозгового вещества на действие «физиологического» раздражителя (мнимое облучение) и ионизирующее излучение имеет в пределах первых пяти минут различный характер: в первом случае сдвиг ИЭТ РНП гранулярных структур направлен в кислую сторону, тогда как после облучения сдвиг реализуется в щелочном направлении; суммация обоих процессов приводит к мнимой нормализации после радиационного воздействия, быстро сменяющейся значительным вторичным кислотным сдвигом ИЭТ.

4. Радиобиологическая реактивность свойственна всем клеткам мозгового вещества надпочечника — его интрамуральным нервным и хромаффинным элементам; однако для каждого конкретного образования интенсивность проявления неодинакова, направленность процессов различна, временные сроки и последовательность вовлечения различных органоидов в ответ на действие ионизирующего излучения не сходны. Гистохимическое исследование рибонуклеопротеидов в обоих типах клеток конкретизирует своеобразие свойственных им реакций.

Лаборатория по изучению нервных
и гуморальных регуляций АН СССР,
Институт биохимии АН Армянской ССР

Поступило 16.II 1966 г.

Ա. Լ. ՇԱԲԱԴԱՇ, Մ. Ա. ՌՈՍՏՈՄՅԱՆ

ՄԱԿԵՐԻԿԱՄԵՆԵՐԻ ՄԻՋՈՒԿԱՅԻՆ, ՆՅՈՒԹԻ ԲՋԻՉՆԵՐԻ ՆՈՒՎԵՆՈՊՐՈՏՆԵՐԻՆԵՐԻ
ՀԻՍՏՈՔԻՄԻԱԿԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԳԱՄԱ-ՃԱՌԱԳԱՅԹԱՀԱՐՈՒՄԻՑ
ՀՏՏՈ ՎԱԿ ԺԱՄԿԵՏՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Աշխատության մեջ բերված են առնետների մակերիկամների միջուկային նյութի բրոմաֆինային և ինտրամուրալ ներվային բջիջների նուկլեոպրոտեիդների հիստոքիմիական հետազոտության արդյունքները գամա-ճառագայթների ազդեցության տակ 1000 ունտգեն դոզայով:

Հետազոտությունները կատարվել են ճառագայթահարումից 1, 10, 20, 30, 60 րոպեից, 3 ժամից և 1, 2, 3, 4 օրից հետո:

Փոփոխությունների շափանիչ են ծառայել բջիջների տարբեր օրգանոիդներում տեղակայված պրոնուկլեոպրոտեիդների իզոէլեկտրիկ կետերի ցուցանիշները:

Տարբեր օրգանոիդների պրոնուկլեոպրոտեիդների իզոէլեկտրիկ կետերի փոփոխության դինամիկայի հետազոտությունը ճառագայթահարումից հետո պարզել է, որ այն ալիքաձև է:

Առաջինը իոնացնող ճառագայթմանը արձագանքում են մակերիկամների ինտրամուրալ ներվային բջիջների միտոքոնդրիանների պրոնուկլեոպրոտեիդները, որից հետո ունակցիայի մեջ են մտնում բրոմաֆինային բջիջների միտոքոնդրիանների պրոնուկլեոպրոտեիդները: Մակերիկամի միջուկային նյութի բրոմաֆինային բջիջները ֆիզիոլոգիական (կեղծ ճառագայթահարում) և իոնացնող ճառագայթման ազդեցության տակ առաջին 5 րոպեի ընթացքում ունեն տարբեր բնույթ. առաջին դեպքում պրոնուկլեոպրոտեիդների իզոէլեկտրիկ կետի տեղաշարժը գրանույար ստրուկտուրաներում ուղղված է դեպի թթվային, իսկ ճառագայթահարումից հետո՝ դեպի հիմնային կողմը:

Այս երկու պրոցեսների գումարը բերում է ճառագայթահարումից անմիջապես հետո կարճեցյալ նորմալացման, որը արագությամբ փոխարինվում է իզոէլեկտրիկ կետի երկրորդային թթվային տեղաշարժով:

Ռադիոբիոլոգիական սեակտիվությունը հատուկ է մակերիկամի միջուկային նյութի բոլոր ուսումնասիրված բջիջներին՝ նրա ինտրամուրալ ներվային և քրոմաֆինային էլեմենտներին:

Սակայն ճառագայթաճարման ներդրծության տակ ամեն մի կոնկրետ գոյացության համար փոփոխությունների շափր, պրոպեոսների ուղղությունը, տեղությունը և հաջորդականությունը տարբեր են: Ռիբոնուկլեոպրոտեինների հիստոքիմիական ուսումնասիրությունը երկու տիպի բջիջներում էլ որոշակի է դարձնում նրանց բնորոշ սեակցիայի յուրահատկությունը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Лебединский А. В. и Нахильницкая З. Н. Влияние ионизирующих излучений на нервную систему. Госатомиздат. 1960.
2. Лившиц Н. Н. Влияние ионизирующих излучений на функции центральной нервной системы. Изд-во АН СССР, 1961.
3. Шабаташ А. Л. ДАН СССР, 114, 3, 659, 1957.
4. Шабаташ А. Л. Архив АГЭ, 35, сообщ. I, 1, 3, сообщ. II, 4, 3, 1958.
5. Шабаташ А. Л. Цитология, I, 1, 15, 1959.
6. Шабаташ А. Л., Зеликина Т. И., Аграчева Н. Д. ДАН СССР, 128, 6, 1290, 1959.
7. Шабаташ А. Л., Зеликина Т. И., Аграчева Н. Д. ДАН СССР, 136, 1, 222, 1961.
8. Шабаташ А. Л., Зеликина Т. И., Аграчева Н. Д. Радиобиология, 2, 1, 105, 1962.
9. Шабаташ А. Л., Зеликина Т. И., Аграчева Н. Д. ДАН СССР, 145, 3, 657, 1962.
10. Шабаташ А. Л., Зеликина Т. И., Аграчева Н. Д. Архив АГЭ, 44, 2, 3, 1963.
11. Effects of ionizing radiation on the nervous system. Internat. Atomic Energy Agency. Vienna (Foreword), 1962.