

© В.Г.СИПОВСКИЙ

УДК 616.233+616.36]-018.1-008.931-076.4]-091.1-092.9

УЛЬТРАЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ФОСФАТАЗ В РАННЕМ ПОСМЕРТНОМ ПЕРИОДЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

В.Г.СИПОВСКИЙ

Санкт-Петербургский медицинский университет им. акад. И.П.Павлова

В клетках эпителия главных бронхов и гепатоцитах крыс ультрацитохимически определяли активность кислой фосфатазы (КФ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (ГЭФ), тиаминпирофосфатазы (ТРП) в течение 1-5 часов после смерти животных. В течение посмертного периода наряду с сохранением активности одних энзимов (КФ, ГЭФ), в клетках отмечено угнетение других (ТРП). Кроме того, были выявлены нетипичные места внутриклеточной локализации продуктов реакции на КФ.

Изучению изменений активности ферментов клеток в раннем посмертном периоде посвящено значительное количество работ [1, 2, 3, 4]. Это связано с широким использованием аутопсийного материала в научной и практической деятельности [5, 6, 7, 8]. Однако современные представления об изменении активности ферментов в раннем посмертном периоде были бы недостаточно полными без данных ультрацитохимических исследований. В литературе встречаются лишь единичные исследования [9, 10], касающиеся данной проблемы.

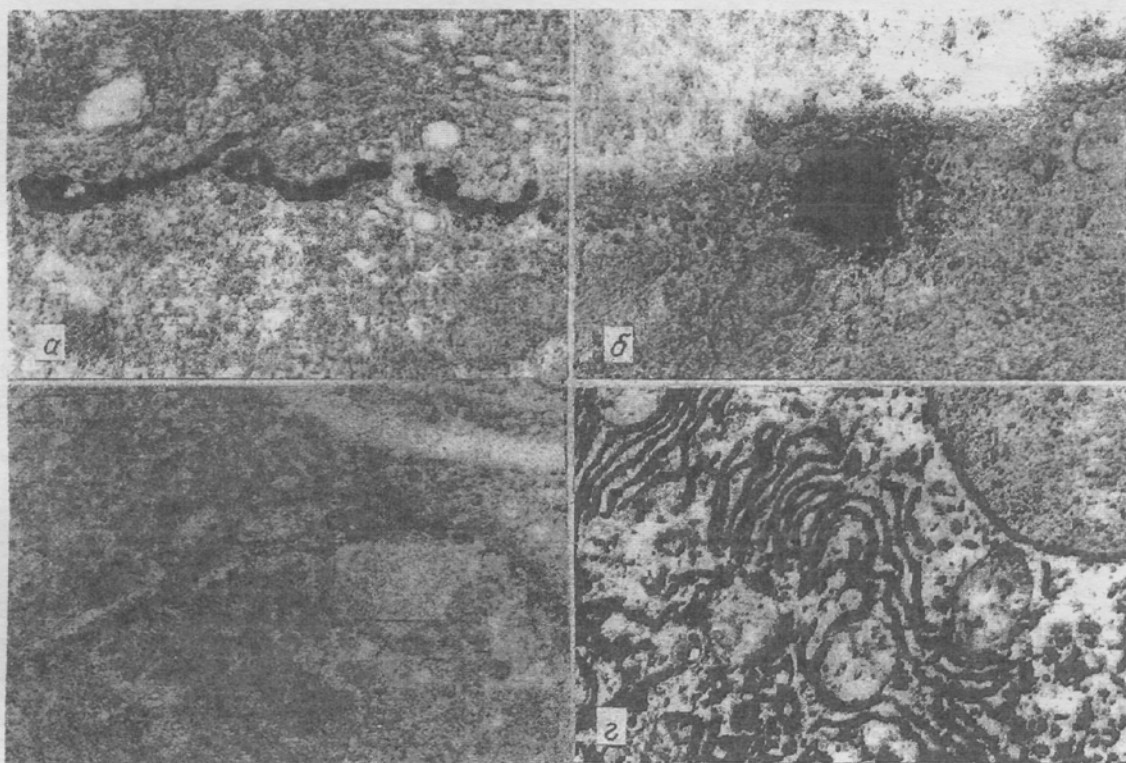
Целью настоящей работы явился анализ изменений активности ряда ферментов при ультрацитохимическом способе их выявления в некоторых клетках у экспериментальных животных в течение ранних сроков посмертного периода.

Методика. Исследования проводили на белых беспородных крысах массой 150-200 г, содержащихся в стандартных условиях. Интактных крыс умерщвляли под наркозом посредством механической асфиксии. Тела животных выдерживали при комнатной температуре и влажности воздуха 40-60%. Исследовали клетки главных бронхов и гепатоциты. Для этого кусочки иссекали сразу (контроль), а также через 1, 2, 3, 4, 5 ч после смерти животных. На каждую временную точку брали не менее 5 крыс.

Для электронной микроскопии кусочки фиксировали в альдегидном фиксаторе, содержащем 2,5% глutarового альдегида, 2% параформальдегида на 0,1 М фосфатном буфере. При исследовании печени использовали фиксацию раствором, охлажденным до 4°C. Затем кусочки помещали в ацетатвероналовый 0,05 М буфер с 4% сахарозой. Материал дофиксировали 1% забуференным раствором OsO_4 , контрастировали уранилацетатом. Перед осмированием цитохимическую активность кислой фосфатазы (КФ; КФ 3.1.3.2), тиаминпирофосфатазы (ТПФ) и глюкозо-6-фосфатазы (Г-6-Ф; КФ 3.1.3.9) выявляли цериевым методом [11]. После обезвоживания в спиртах материал заливали в смесь эпоксидных смол эпона и аралдита. Ультратомию проводили на ульт-

тратоме LKB-III, а исследование субмикроскопического строения клеток — на трансмиссионном электронном микроскопе JEM-7A.

Результаты и обсуждение. Электронно-микроскопически в раннем посмертном периоде в исследованных клетках были обнаружены общеизвестные изменения органелл [12, 13, 14, 15]. При субмикроскопическом исследовании у животных контрольной группы активность КФ отмечалась в транс-цистернах аппарата Гольджи (АГ) и лизосомах (см. рисунок, а). Следует отметить, что в большинстве клеток каких-либо изменений локализации КФ в клетках в пределах 1-5 ч после смерти не происходило. Однако в некоторых клетках через 2-3 ч активность КФ наблюдалась в других цистернах АГ и эндоплазматического ретикулума. Кроме того, выявлялась диффузия КФ в цитозоль из лизосом (см. рисунок, б). Этот феномен был описан нами ранее [12].



Ультраструктурная локализация активности КФ, ТПФ и Г-6-Ф в клетках главных бронхов и гепатоцитах после смерти животных.

а — сразу после смерти животного продукт реакции на КФ располагается в цистернах аппарата Гольджи и пузырьках эпителиальных клеток главных бронхов. Ув. 42 280; б — через 2 ч после смерти продукт реакции на КФ наблюдается в лизосомах и цитозоле клетки эпителия бронхов. Ув. 42 280; в — через 3 ч после смерти животного продукт реакции на ТПФ сохраняется лишь в виде отдельных электронно-плотных преципитатов по ходу цистерн аппарата Гольджи в реснитчатой клетке эпителия бронхов. Ув. 41 440; г — через 5 ч после смерти животного, несмотря на повреждения органелл, локализация продукта на Г-6-Ф в гепатоците не изменена по сравнению с исходной. Ув. 41 440.

Электронно-микроскопическое исследование ТПФ в клетках реснитчатого эпителия выявило активность фермента в цистернах АГ. После смерти животных к 3 ч эксперимента отмечалось угнетение активности ТПФ, поскольку продукты реакции выявлялись лишь в виде отдельных точек по ходу цистерн пластинчатого комплекса (см. рисунок, в). Через 5 ч после смерти животных в реснитчатых клетках фермент вообще не удалось выявить.

Г-6-Ф у животных контрольной группы располагался в цистернах эндоплазматического ретикулума гепатоцитов. Несмотря на то, что данный фермент чувствителен к неблагоприятным воздействиям [11, 16], в настоящей работе было установлено, что его

активность сохранялась в органеллах на протяжении всего эксперимента (см. рисунок, г).

Таким образом, исследование активности ряда ферментов (КФ, ТПФ, Г-6-Ф) в клетках главных бронхов и гепатоцитах позволило выявить ряд особенностей поведения данных энзимов в раннем посмертном периоде. Как указывалось ранее, наряду с сохранением активности одних энзимов (КФ, Г-6-Ф) в клетках может отмечаться угнетение и даже полное подавление активности других энзимов (ТПФ). Вместе с тем вплоть до 5 ч опыта продукты реакции на некоторые энзимы не изменяли существенным образом своей локализации по сравнению с прижизненной (Г-6-Ф). Однако в раннем посмертном периоде были отмечены также и новые места внутриклеточной локализации продуктов реакции (КФ). На наш взгляд, описанные выше феномены связаны со структурно-метаболическими изменениями клеток в раннем посмертном периоде [11, 17, 18].

ЛИТЕРАТУРА

1. Жаботинский Ю.М., Войно-Ясенецкий М.В. Источники ошибок при морфологических исследованиях. — Л., 1970.
2. Лушников Е.Ф., Загребин В.М. Некроз. Аутолиз. — М., 1981.
3. Ребров Л.Б., Козельцев В.Л., Шишкин С.С. // Вестн. АМН СССР. — 1983. — № 10. — С. 83-88.
4. Ericsson Z.L., Biberfeld K., Seljelid R. // Acta path. microbiol. scand. — 1967. — Vol. 70. — P. 215-228.
5. Выриков К.А., Клещиков В.З. // Труды Л.Н.О.П. — 1989. — Т. 30. — С. 91-94.
6. Цыпленкова В.Г., Вихерт А.М. // Арх. пат. — 1981. — Т. 43, № 4. — С. 34-40.
7. Frederiks W.M., Marx F. // Histochemistry. — 1989. — Vol. 93. — P. 161-166.
8. Herdson P.B., Kalenbach I.P., Jennings R.B. // Amer. J. Path. — 1969. — Vol. 57, № 3. — P. 539-557.
9. Грибанов Г.А. // Вопр. мед. химии. — 1977. — Т. 23, № 3. — С. 381-385.
10. Artiger L.C., Seelye R.N., Carnelle V.M. et al. // Lab. Invest. — 1976. — Vol. 34, № 4. — P. 357-362.
11. Robinson J.M., Karnovsky M.I. // J. Histochem. Cytochem. — 1983. — Vol. 31. — P. 1197-1208.
12. Лопухин Ю.М., Козан Э.М., Караганов Я.Л. Ультраструктурные основы жизнеспособности печени, почек и сердца. — М., 1977.
13. Lee R.M.K., Rossman C.M., O'Brodovich H. // Amer. Rev. resp. Dis. — 1987. — Vol. 136, № 2. — P. 445-447.
14. Trump B.F., Mergner W.I., Kanug M.W., Saladino A.J. // Circulation. — 1976. — Vol. 53, № 3. — P. 17-26.
15. Vighon X., Beaulaton J., Ouali A. // Histochem. J. — 1989. — Vol. 21. — P. 403-411.
16. Robinson J.M., Karnovsky M.I. // J. Histochem. Cytochem., 1983-Vol.31 — P. 1190-1196.
17. Голубев В.Г., Козельцев В.Л., Грибанов Г.А. // Вопр. мед. химии. — 1987. — Т. 33, № 6. — С. 114-118.
18. Грибанов Г.А., Щеникова В.В. // Там же. — 1983. — Т. 29, № 3. — С. 53-57.

ULTRACYTOCHEMICAL STUDY OF THE ACTIVITIES OF SOME PHOSPHATASES IN THE EARLY POSTMORTEM PERIOD OF EXPERIMENTAL ANIMALS

V. G. Sipovsky

Academician I. P. Pavlov Saint Petersburg Medical University

The activities of acid phosphatase (AP), glucose-6-phosphatase (G-6-P), and thiamine pyrophosphatase (TPP) were assayed in the epithelial cells of the main bronchi and hepatocytes of rats within 1 to 5 hours after their death. In the postmortem period, some enzymes (AC, G-6-P) retained their activity while the others (TPP) were inhibited. Furthermore, there were unusual intracellular sites of AP reaction products.