

А. В. РУМЯНЦЕВ

**ВЛИЯНИЕ «ВИТАЛЬНЫХ» КРАСИТЕЛЕЙ НА УГЛЕВОДНЫЙ ОБМЕН
РАСТУЩЕЙ IN VITRO ТКАНИ**

(Представлено академиком И. И. Шмальгаузенем 9 VIII 1939)

Витальное окрашивание, или вернее отложение красок в растущей in vitro ткани, изучено довольно подробно. Можно считать установленным, что и кислые и основные краски, проникая в клетку, вызывают в ее протоплазме образование вакуолек, являющихся центром дальнейшего отложения краски (Леви 1928; Румянцев 1935, 1937 и др.). Опыты длительного окрашивания показывают, что существует предел накопления краски, дальше которого не удастся получить образования новых окрашенных вакуолей, или же вызвать увеличение отложения краски в уже образовавшихся (Хлопин 1927, Кедровский 1937).

Кедровский (1937) дал достаточно убедительные доказательства того, что при окраске in vivo краситель извлекает из протоплазмы кислые коллоиды, соединяющиеся с краской. Перегруженные красителем клетки способны размножаться (Леви 1928, Румянцев 1937). По структуре цитоплазмы и ядра можно заключить, что клетки не обнаруживают признаков дегенерации и могут некоторое время жить в культурах.

Однако возникает ряд вопросов, которые до сих пор очень мало затрагивались по отношению растущей in vitro ткани. Прежде всего можно ли считать «нормальными» перегруженные красителем клетки, и какова дальнейшая судьба отложенного в протоплазме красителя?

Для ответа на поставленные вопросы мы решили: 1) обследовать обмен окрашенных культур, и 2) проследить в пассажах судьбу окрашенных гранул.

В настоящем исследовании излагаются результаты по изучению углеводного обмена окрашенных до предела культур.

Материал и методика. Ткань сердца 8-дневного куриного эмбриона. Среда: плазмы 6ч. + 2 ч. краски на физиологическом растворе + 2 ч. глюкозы на физиологическом растворе. Концентрация глюкозы 0.15%. Испытывались следующие красители: нейтральная красная (N.R), метиленовая синь (M.V.), проловая голубая (P.V). Красители добавлялись в таких концентрациях, чтобы окончательное разбавление в среде культур было для M.V. 1 : 10000 и 1 : 20000; для N.R. 1 : 25000 и 1 : 50000; для P.V. 1 : 5000.

Для изучения углеводного обмена растущей ткани, мы определяли количество сахара в среде 48-часовых культур; определения велись по методу

Хагедорна—Иенсена¹. Для определения сахара мы брали по несколько культур, так как отдельные культуры дают очень большие размахи колебания в потреблении сахара из окружающей среды: от 30% до 70%.

I. Опыт с N. R.

	Среда	Число культур	Вес культур в мг	Найденное количество сахара в мг%	% потребления сахара по сравнению с пустышкой	% потребления сахара по сравнению с контролем ²
Серия I	плазма +					
	глюкоза +	4	101	78	53	—
	эмбрионный сок	6	203	61	63	—
Контроль	пустышки (среда без кусочка),	6	276	165	—	—
	та же, что и в контроле + N. R. общ. концентрация	6	162	71	51	уменьшение на 7%
	1 : 50000	6	171	62	57	
Опыт	пустышки	6	215	148	—	
	(среда без кусочка)	4	103	145	—	
Серия II	плазма +					
	глюкоза + эмбрионный сок	9	200	118	39	—
	та же, но без ткани	6	237	194	—	—
Контроль	плазма + глюкоза + эмбрионный экстр. + N. R. общ. концентрации 1 : 25000	9	196	142	42	увеличение на 7%
	та же, но без ткани	9	184	248	—	
Опыт	плазма + глюкоза + эмбрионный экстр. + N. R. общ. концентрации 1 : 25000	9	196	142	42	увеличение на 7%
	та же, но без ткани	9	184	248	—	

На фиг. 1. представлены одновременно рост и потребление сахара, причем за 100% взяты величины контроля.

Наблюдения за ростом показали, что культуры давали отличный рост, и величины зон через 48 часов были совершенно одинаковы. То же самое можно сказать и про потребление сахара; его потребление было практически одинаковым в обеих сериях и мало отличалось от контроля. Некоторое уменьшение потребления на 7% в опыте I и увеличение в опыте II лежат в пределах допустимой ошибки и потому не могут считаться результатом воздействия краски.

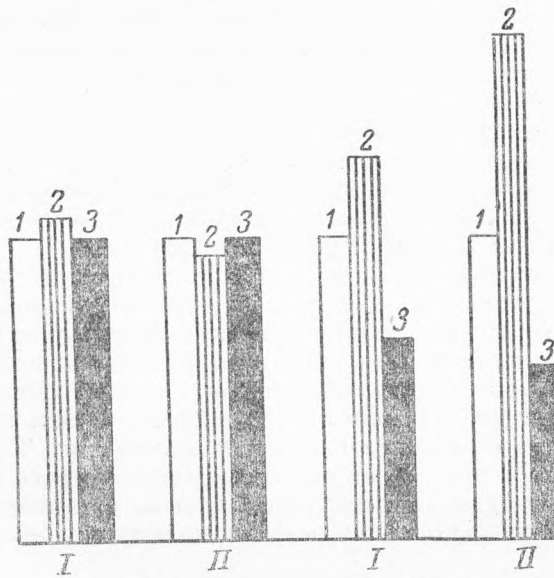
¹ Этот метод не совсем точен.

² При высчитывании сравнительного процента потребления были взяты средние из найденных величин.

II. Опыты с М. В.

Серия	Среда	Число культур	Вес культур в мг	Найденное количество сахара	Потребление сахара в мг%	Потребление сахара в % по сравнению с контролем
	плазма + глюкоза + эмб. экс.	6	210	237	29	—
	та же, но без ткани . . .	6	200	321	—	—
Опыт I	та же + М. В.	6	240	106	39	} +65
	общая концентрация 1:10000	6	157	73	58	
	та же, но без ткани . . .	6	185	174	—	
Опыт II	та же + М. В.	6	222	210	37	} +24
	общая концентрация 1:20000	6	220	217	35	
	та же, но без ткани . . .	6	196	233	—	

Как показывает фиг. 2, рост в общем был не плохой. Однако, как в опыте I, так и в опыте II рост меньше, чем в культурах контрольных, причем в концентрации большей (1:10000) задержка больше на 45%, а в меньшей на



33%. Одновременно потребление сахара по сравнению с контролем больше, причем в опыте I оно превышает контроль на 65%, а в опыте II только на 24%.

Принимая во внимание задержку в росте, т. е. уменьшение количества ткани при увеличении потребления сахара, можно сделать вывод, что М. В. стимулирует потребление сахара растущей *in vitro* тканью, но одновременно задерживается пролиферация клеток.

III. Опыт Р. В. Сахар определялся через 48 часов.

Серия	Среда	Число культур	Вес культур в мг	Найденное количество сахара в мг %	% потребления сахара по сравнению с пустышкой
I РВ	Плазма + глюкоза + РВ + эмбр. экс. (РВ—1:500) . .	10	251	104	65
	Та же, но без кусочка (пустышка)	6	185	298	—
II РВ	Плазма + глюкоза + РВ + + эмбр. экст. РВ 1:500 .	5	188	129	47
	Пустышка	5	231	245	—

Культуры росли отлично и между опытом и контролем не было никакого различия: абсолютный прирост площади в контроле—37.04, а в опыте—37; потребление сахара в контроле в опыте I—60%, в II—54%.

Таким образом не было никакого различия и в величине потребления сахара. Нагружение клеток Р. В. не оказало влияния ни на рост, ни на обмен.

В ы в о д ы. Высаженные *in vitro* в среду с красителем миобласты сердца куриного зародыша перегружаются накапливающейся в их протоплазме краской. Наибольшее количество окрашенных гранул образуется в N. R. (почти вся протоплазма заполнена окрашенными гранулами), немного менее в M. V. и меньше всего в P. V. Перегруженные красителем клетки размножаются, образуют хорошую зону роста, причем некоторая задержка роста наблюдалась только в M. V.; в N. R и в P. V. практически рост не отличался от контроля (см. фиг. 1). Определение потребления сахара показало, что M. V. немного стимулирует потребление сахара, в то время как N. R. и P. V. не оказывает никакого влияния.

Исходя из полученных данных можно допустить, что загрузка «вакуома» клетки краской и усиленное образование нового «крякома» не ведет к изменению углеводного обмена; следовательно к расщеплению сахара «вакуом» клетки не имеет никакого отношения, а потому гипотеза об его значении, как ферментативного депо, не получает подтверждения. Очевидно, процесс расщепления сахара происходит или по поверхности, или по всей толще незатронутой краской цитоплазмы. Если это так, то нельзя ли и на весь процесс отложения краски смотреть как на модель, позволяющую нам судить об явлениях защиты, возникающих в системе протоплазмы при попадании в нее веществ, не могущих быть вовлеченными в метаболизм?

Установленная нами стимуляция потребления сахара M. V. и отсутствие стимуляции в N. R. и P. V. находятся в полном согласии с литературными данными. Сахар является основным энергетическим источником. При увеличении потребления O₂, очевидно, ткань использует больше сахара, чем в норме; следовательно по сахару можно косвенно судить о величине дыхания, и наоборот. Поэтому нам очень интересны данные по дыханию тканей в присутствии красок. Можно считать установленным, что M. V. повышает потребление O₂ у неоплодотворенных яиц морских ежей и звезд, эритроцитов и у некоторых тканей млекопитающих (Баррон и его уче-

ники 1928 1930, Брукс 1932, Орштрем 1932, Рунштрем 1930 и др.), в то время как N. R. и например Тгуранблау совершенно индифферентны (Баррон и Гофман 1930, Аксмахер 1933) и не действуют на углеводный метаболизм. По нашим данным, углеводный метаболизм повышается только при наличии M. V., несмотря на задержку роста. Если это так, то значит каталитическое действие краски не зависит от проникновения краски в клетку, ибо в наших опытах клетки были полностью загружены красками. Не касаясь механизма самого воздействия, мы все же можем считать предположение Баррона и Гофмана, что действительными как катализаторы являются только те краски, которые могут обратимо окисляться и редуцироваться, наиболее вероятным, но мы отрицали бы большое значение проницаемости.

В наших опытах все краски одинаково хорошо проникали в клетки, а между тем эффект действия можно обнаружить только для M. V. Наблюдения над изменениями отложенных красок в длительных культурах показывают, что раньше всего исчезает, обесцвечиваясь, N. R., в то время как гранулы M. V. остаются и в дальнейших пассажах; причем если процесс исчезновения гранул в N. R. и P. V. приблизительно одинаков, то M. V. уже имеет отличия, да и вообще M. V. более длительное время остается в пассажных культурах, чем N. R. или P. V. Поскольку пассажи сильно окрашенных культур удавались легко и в дальнейшем после 3-го пассажа N. R. и после 4-го P. V. росли нормально, без следов краски в клетках, можно заключить, что «витальные» красители не поражают основных жизненных структур клетки, и потому перегруженные краской клетки, несмотря на происшедшее от смешивание каких-то кислых протеинов (Кедровский, 1933—1937), можно рассматривать как клетки вполне нормальные.

Поступило
9 VIII 1939

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Levi et Vuoscian te, Arch. f. Exper. Zellfor., B. 7, s. 355 (1928).
² G. Levi, Ergeb. d. Anat. u. Entw., B. 31, s. 125 (1934) (там же дальнейшая литература). ³ А. Румянцев, Арх. анат. гистол., XIV, стр. 321 (1935); Arch. d'Anat. Microscop. (1937). ⁴ Н. Хлопин, Arch. f. Experim. Zellfor., B. 4, s. 462 (1927). ⁵ Б. Кедровский, Zeit. f. Zellfor., B. 25, s. 694 (1937). ⁶ Barron, Jour. Biol. Chem., v. 86, p. 445 (1928). ⁷ Barron a. Hoffman, Jour. Gener. Phys. v. 13, p. 483 (1930). ⁸ M. Brooks, Am. Jour. of Physiol., v. 52, 145 (1932). ⁹ Runström, Protoplasma, v. 10, s. 106 (1930); v. 20, p. 1. (1932). ¹⁰ Orström, Protoplasma, v. 15, p. 566. ¹¹ Axmacher, Arch. f. Exper. Pathol. u. Pharm., B. 170, s. 51, s. 47² (1933).