

МЕХАНИКА РАЗВИТИЯ

А. В. РУМЯНЦЕВ

ВЛИЯНИЕ ИЗБЫТКА ХЛОРИДОВ (Na, K, Ca) НА РОСТ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ТКАНИ IN VITRO

(Представлено академиком И. И. Шмальгаузенем 16 VI 1938)

Метод погружения кусочков тканей в раствор той или иной соли, применяемый для изучения ее действия на протоплазму, таит много погрешностей. Едва ли результаты, полученные этим методом, можно целиком и полностью переносить на организм, где если и происходит изменение солевого состава, то это изменение выражается всегда в нарушении соотношения солей, т. е. практически в увеличении или соответственно в уменьшении одной какой-либо соли при одновременном наличии других.

В этом отношении более надежные результаты можно получить, изучая действие солей в тканевых культурах, где условия опыта всегда ближе к физиологическим. Исходя из такого взгляда, нам казалось интересным подробно проанализировать действие NaCl, KCl и CaCl₂ на рост, обмен и морфологические изменения растущей в культурах ткани.

Мы не пионеры в поставленной задаче. Уже в свое время супруги Льюисы (Lewis M. and W.), Оливо (Olivo), Менделеева (Mendéleeff), Бишелье и Букчиарди (Biscelle et Bucciardi), Кронтовская (Krontowskja), Демут (Demuth), Кнаке (Knake), Верн (Verne), а недавно Меллендорф (Möllendorff), Гроссфельд (Grossfeld) испытывали влияние различных солей на растущие in vitro клетки. Для нас особенно интересны работы Кронтовской и Демута, которые описывают уменьшение величины клеток почти вдвое по сравнению с контролем при добавлении CaCl₂. Что касается KCl, то в свое время Бишелье и Букчиарди, а недавно Меллендорф устанавливают несомненно набухающее действие этой соли, ведущее к сильной вакуолизации протоплазмы.

Целью нашего исследования мы поставили: 1) изучить общий характер роста; 2) если возможно установить наличие специфического длительного воздействия на растущую ткань той или иной соли, взятой в избытке.

Материал и методика работы. Ткань сердца 6—8-дневного куриного эмбриона выращивалась в среде, составленной из: 1 части плазмы + 2 части испытуемого раствора. Испытывались следующие растворы: NaCl—0.9%; KCl—1.11%; CaCl₂—1.26%. Кусочки нарезались в испытуемом растворе и содержались в нем в течение 1/2 часа. Контроль—культуры на плазме, разбавленной раствором Рингера. Рост культур определялся приростом площади по методу Иблинга (Ebling). Суждение о величине и форме клеток мы получали, измеряя два диаметра ядра. Так как форма ядра в большинстве случаев соответствует форме клеток (вытянутые клетки—длинные эллипсоидные ядра; распластанные звездчатые—круглые большие ядра), то отношение диаметров давало нам право говорить о форме ядер соответствующих клеток, а произведение диаметров—об их относительной величине. Всего в нашем распоряжении было 960 культур, из них 400 контрольных.

Результаты наблюдений

Известно, что в норме 1—2% культур обычно не растут. При подсчете нерастущих и плохо растущих культур на 300 культур для каждой соли оказалось для культур с NaCl 5%, с KCl 12%, с CaCl₂ 20%.

Первоначально нам казалось, что здесь дело идет об ядовитости этих солей. Однако, сделав пересев нерастущих кусочков в нормальную среду, мы получили рост. Очевидно явление зависит от каких-то иных причин, возможно прежде всего от характера сгустка.

В табл. 1 представлены результаты измерений абсолютного прироста ткани по дням. Из этой таблицы с очевидностью следует, что избыток NaCl практически в первые два дня культивирования не задерживает роста, в то время как CaCl₂ и KCl рост задерживают. На 3-й день наибольшая задержка роста отмечается для CaCl₂. Сопоставляя однако величину зоны прироста с ее густотой (количеством клеток в зоне), можно уже при простом наблюдении убедиться, что зона в культурах с CaCl₂ значительно плотнее, чем в KCl. Влияние NaCl практически по сравнению с контролем не сказывается. Изучая вообще характер клеточного материала в зоне роста, можно убедиться, что в контрольных культурах поверхностная зона состоит из типичных клеток. В культурах с добавлением NaCl и KCl рост идет главным образом по стеклу, зона вставания в плазму обычно выражена слабо. При CaCl₂ рост идет во все стороны равномерно. Поскольку доказано, что плотность сгустка [Вейсс, Гроссфельд (Weiss, Grossfeld)] определяет характер клеток, можно заключить, что KCl не благоприятствует образованию плотной фибриновой сетки, что частично и определяет внешнюю форму клеток. При NaCl клетки как по своей внешней форме, так и по характеру соединения друг с другом в первые два дня не отличаются от контрольных, но на третьи сутки появляются клетки большие с вакуолизированной протоплазмой.

При KCl проявляется очевидная тенденция к образованию мембраны, состоящей только из полигональных клеток, причем вакуолизация их протоплазмы обнаруживается уже к концу первого дня, а на третий день большинство клеток отчетливо вакуолизировано. При CaCl₂ в зоне роста наряду с полигональными и звездчатыми много клеток вытянутых; впрочем встречаются и угольчатые. Как правило при CaCl₂ клетки соединены хорошо выраженными тонкими отростками и образуют характерную войлоковидную массу ткани, в то время как при KCl клетки имеют тенденцию к образованию гиалиновой эктоплазмы и к отхождению друг от друга.

Таблица 1
Отношение двух измененных диаметров у ядер клеток в зоне роста

| Культуры | N | M ± m |
|-----------------------------|-----|------------|
| Контроль . . . | 230 | 2.0 ± 0.04 |
| NaCl | 248 | 2.1 ± 0.04 |
| KCl | 234 | 2.0 ± 0.05 |
| CaCl ₂ | 256 | 2.5 ± 0.06 |

Как уже отмечалось Долиотти, Вермелем и Игнатъевой, величина клеток и их ядер в культурах варьирует. Мы изучали только ядра, считая, что хотя и нет точного соотношения между ядрами и протоплазмой (см. Долиотти), но все же большие ядра всегда характерны для больших клеток и наоборот. Мы измеряли от 25 до 30 ядер в зоне роста 10—15 культур для каждой соли одной и той же серии.

При обработке полученных результатов оказалось, что среднее для величины, показывающей отношение двух диаметров, практически одинаково как для контроля,

так и для NaCl и KCl, увеличиваясь в сторону удлинения только в CaCl₂ на 20% по сравнению с контролем.

Как показал нам дальнейший анализ, удлинение клеток зависит и от того, что клетки растут в более полном сгустке плазмы, и от специфического воздействия CaCl₂, действующего уплотняюще на протоплазму клеток. Однако эти данные еще ничего не говорят о величине ядер, для этого нужно было бы измерить их объем.

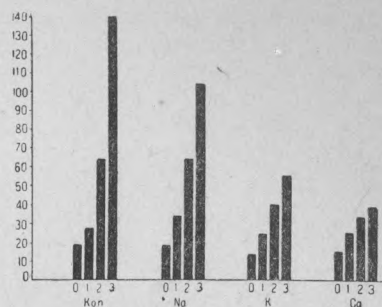
Поскольку в зоне роста поверхностные клетки растут, распластываясь по слизи, третий диаметр их ядер, необходимый для определения объема, очень мал и точно измерен быть не может. Поэтому мы можем им пренебречь, считая, что он приблизительно

одинаков у всех ядер, а для сравнения взять только произведение из двух диаметров, т. е. практически заменить величину и объем ядер площадью прямоугольника, в который вписано ядро.

Составленные для каждой серии вариационные ряды площадей были обработаны и дали следующие результаты (табл. 2).

Подобные результаты мы получили и при добавлении к среде минимального количества эмбрионального экстракта (таблица 3).

Кривые, составленные для полученных рядов, наглядно демонстрируют изменения в различных культурах. Прежде всего они асимметричны и эксцессивны. Кривые для NaCl более всего приближаются к контролю. Наиболее высокая вершинная кривая для CaCl₂; KCl занимает как бы промежуточное положение. Вся кривая для CaCl₂ сдвинута влево, причем по сравнению с контролем происходит значительное уменьшение ядер — практически на 40%, а следовательно уменьшение и протоплазмы клеток. Анализируя полученные ряды, мы приходим к заключению, что различие между контролем M_{Kon} и M_{Na} , M_{K} не существенно, в то время как для M_{Ca} вычисленное отношение дает существенную разницу.



Фиг. 1.—Среднее из 300 измерений для каждой соли. Культуры без эмбрионального экстракта. 0—величина при посадке; 1, 2, 3—дни; Kon—контрольные культуры.

Таблица 2

$$M_{\text{Kon}} - M_{\text{Na}} \pm \sqrt{\sum m^2} = \frac{6.08 \pm 1.63}{3.7:1}$$

Для культур без добавления эмбрионального экстракта

$$M_{\text{Kon}} - M_{\text{K}} \pm \sqrt{\sum m^2} = \frac{3.65 \pm 1.52}{2.4:1}$$

В обоих случаях различие не существенно.

$$M_{\text{Kon}} - M_{\text{Ca}} \pm \sqrt{\sum m^2} = \frac{19.10 \pm 1.43}{13.3:1}$$

— различие существенно.

| Культуры | N | $M \pm m$ | C, % | Q, %* |
|-----------------------------|-----|-----------------|------|-------|
| Контроль | 294 | 50.9 ± 1.24 | 41 | — |
| NaCl | 422 | 52.0 ± 1.64 | 64 | + 2.2 |
| KCl | 388 | 48.9 ± 1.11 | 51 | - 3.9 |
| CaCl ₂ | 394 | 30.9 ± 0.6 | 40 | - 39 |

Принимая во внимание изменения ядер, делающихся вытянутыми в CaCl₂, а также постоянно наблюдаемую густоту зоны роста, приходится признать, что CaCl₂ вызывает специфические изменения, выражающиеся в удлинении и одновременно уменьшении клеток, что в первую очередь может быть объяснено дегидратацией протоплазмы. Что же касается культур с NaCl и KCl, то рост почти не отличается от нормы, однако наступление быстрой вакуолизации в присутствии KCl указывает на усиленную гидратацию протоплазмы.

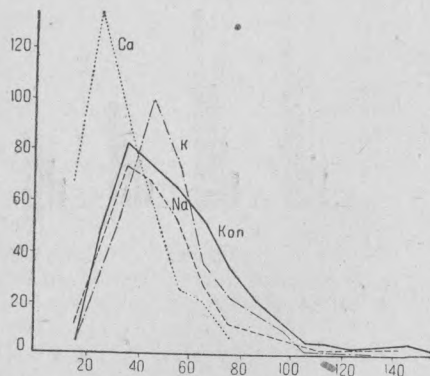
Таблица 3

Для культур с минимальным количеством экстракта

| Культуры | N | $M \pm m$ | σ | C, % | S | Q, % |
|-----------------------------|-----|----------------|----------|------|------|--------|
| Контроль | 400 | 52.7 ± 1.2 | 24.02 | 45.0 | 1.11 | — |
| NaCl | 300 | 46.7 ± 1.1 | 19.1 | 41.5 | 1.3 | - 11.3 |
| KCl | 400 | 49.1 ± 0.9 | 19.02 | 38.8 | 1.2 | - 6.8 |
| CaCl ₂ | 400 | 33.6 ± 0.7 | 15.64 | 47.4 | 1.08 | - 36.2 |

* При вычислении Q, т. е. % изменений величины по сравнению с величиной в контроле, мы обозначаем знаком + % увеличения, а знаком — % уменьшения по сравнению с контролем.

Выводы. 1. Избыток NaCl не сказывается заметно на характере роста ткани. Избыток KCl вызывает явную тенденцию к образованию мембран, состоящих из полигональных разьединенных клеток; полигональные клетки быстро вакуолизируются, что указывает на гидратацию их протоплазмы и в дальнейшем на капельное отщепление жидких фаз.



Фиг. 2.—Вариационные кривые ядерных величин в опытных культурах с эмбриональным экстрактом. Коп—контроль.

к склеиванию друг с другом указывают на то, что CaCl_2 необходим для соединения клеток в синцитий так же, как CaCl_2 необходим для соединения blastomeres. В этом отношении мы видим большое сходство с наблюдением Бронстедта (Brönstedt), описавшего подобные явления в опытах над диссоциированной тканью пресноводных губок.

3. Можно считать установленным, что хлориды проявляют некоторую специфичность воздействия на растущую *in vitro* ткань даже тогда, когда одна из солей находится в некотором избытке над другими. Это дает право для сравнения явлений в культурах и в организме, где по данным Кейзера (Keiser) у лягушек избыток ионов K вызывает набухание ткани, а Ca ведет к уплотнению поверхностных мембран клеток.

Лаборатория гистогенеза.
Институт эволюционной морфологии
им. акад. А. Н. Северцова.

Поступило
4 VII 1938.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Brönstedt, Acta Zool. (1936). ² Biscelie, Arch. exper. Zellforsch., 7 (1929).
³ Demuth, Verh. deutsch. path. Ges. Münch., 9 (1931). ⁴ Dagliotti, Arch. f. exper. Zellf., 111 (1926). ⁵ Grossfeld, Protoplasma, 26 (1936). ⁶ Grossfeld, Arch. f. exper. Zellf., 26 (1934). ⁷ Keiser, Ztg. f. Vergl. Phys., 2 (1925). ⁸ Knaake Arch. f. exper. Zellf., 74 (1933). ⁹ Кронтовская, C. R. Soc. Biol., 58 (1930).
¹⁰ M. a. W. Lewis, Am. Journ. Anat., 17 (1915). ¹¹ Mendeleeff, C. R. Soc. Biol., 90 (1924). ¹² Möllendorff, Ztg. f. Zellforsch., 23 (1936). ¹³ Möllendorff, Arch. f. exper. Zellf., 19 (1937). ¹⁴ Olivo, R. Accad. Lincei, 31 (1922).
¹⁵ Weiss, Arch. entw. Mech., 16 (1929). ¹⁶ Вермель Игнатьева, Ztg. f. Zellforsch., 16 (1932). ¹⁷ Verne et Sannié, Bull. Soc. Chem. Biol., XV (1933).