

Б. В. КЕДРОВСКИЙ

**ОТДЕЛЕНИЕ РИБОЗОНУКЛЕИНОВОКИСЛЫХ СОЕДИНЕНИИ
(АНАБОЛИТОВ) ПРИ ПРИЖИЗНЕННОЙ ОКРАСКЕ
ФИБРОБЛАСТОВ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ**

(Представлено академиком Л. А. Орбели 29 I 1948)

В настоящее время известно, что окрашиваемость фиксированной плазмы молодых животных клеток основными красками (базофилия) зависит от присутствия в ней соединений, содержащих сильные коллоидные кислоты; эти соединения были названы мной анаболитами (1-5). При образовании гранул («кринома») в течение прижизненного окрашивания клеток нейтральной краской анаболиты извлекаются поступающей краской из состава цитоплазмы и в соединении с ее молекулами отлагаются внутри возникающих гранул. Будучи обособлены таким путем в чистом виде (витальная краска легко удалима из гранул), они могли быть анализированы и обнаружили следующие свойства (2):

1. Сильное сродство к основным краскам в живой и фиксированной клетке.

2. Низкое положение изоэлектрической точки (между $pH = 1$ и 2) на фиксированном препарате.

3. Избирательная растворимость после фиксации в спирте в 0,1% растворе углекислой соды (Na_2CO_3) и, более трудная, в $M/90$ фосфатно-буферном растворе при $pH = 6,5-7,0$.

4. Содержание фосфора.

5. Окрашиваемость пиронином после окраски метиловой зеленью и пиронином по Паппенгейму (6).

Позже с помощью других методов было показано (7-9), что базофилия клеточной плазмы обусловлена содержанием в ней рибозонуклеиновой (рибонуклеиновой) кислоты. Все свойства анаболитов, выделенных в виде клеточных гранул, характерны для чистых растворов этой кислоты. Тем самым они представляют собой или чистую рибонуклеиновую кислоту, или, что более вероятно, ее сложные соединения.

В этом сообщении описаны результаты изучения анаболитов в культурах фибробластов из сердца 8-10-дневного куриного зародыша при помощи метода прижизненного окрашивания. Применен был обычный метод культивирования в висячей капле, с теми лишь отличиями, что эмбриональный сок был опущен и что для возможности последующей окраски азур-эозином вырезались очень небольшие кусочки ткани, а плазма тонким слоем распределялась на стекле. Для избежания испарения влаги в полость камеры обычно помещались кусочки влажной фильтровальной бумаги.

Отделение анаболитов с помощью прижизненного окрашивания в форме гранул, т. е. образование кринома, было уже отмечено прежде

(¹⁰⁻¹²), но само явление понято не было. В настоящей работе нейтральная красная либо прибавлялась к кровяной плазме до ее свертывания, либо в капле сыворотки приливалась к уже свернувшейся плазме. Конечная концентрация краски колебалась между 1 : 30 000 и 1 : 60 000. Полное обособление анаболитов происходило с трудом и только в более крепких растворах краски, в которых, однако, механизм митоза часто

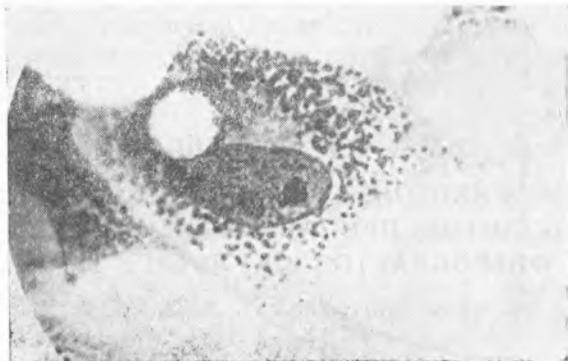


Рис. 1. Фибробласт с гранулами, содержащими анаболиты. Трехдневная культура в присутствии нейтральной красной в разведении 1 : 40 000. Карнуа, эозин-азур

оказывается нарушенным (¹²). Все культуры содержались в темноте. Фиксация и окраска: жидкость Карнуа, азур-эозин.

В течение культивирования в присутствии краски количество кринома, т. е. гранул, содержащих витальную краску и анаболиты, в каждой

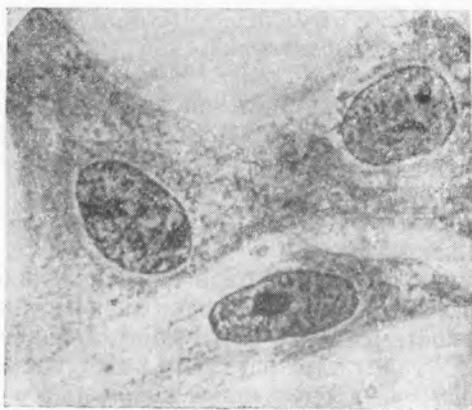


Рис. 2. Фибробласты из контрольной культуры. Карнуа, эозин-азур

клетке постепенно растет. В живой клетке гранулы оранжево-красные, на эозин-азуровом препарате сине-лиловые. В то же время на фиксированных препаратах наблюдается постепенное падение базофилии цитоплазмы вплоть до почти полной утраты этого свойства очень многими клетками через 50—70 час. от начала культивирования (рис. 1; ср. с контрольной клеткой на рис. 2). Слабо окрашены лишь клеточные отростки, где гранулы отсутствуют. Эта утрата окрашиваемости особенно яс-

но обнаруживается, если культуры с краской и без краски культивируются на одном стекле и позже одинаково обрабатываются.

Картины полного или почти полного обособления анаболитов из состава клеточной плазмы наблюдались лишь в тех культурах, где клетки успевали накопить особенно много краски до появления признаков угнетения. В большинстве клеток, однако, дело и здесь ограничивалось лишь явным уменьшением диффузно распределенного базофильного материала, особенно вокруг гранул. Другими словами, в эмбриональных фибробластах 8—10-дневного куриного эмбриона отделение анаболитов из цитоплазмы происходит с трудом, как это вообще свойственно более молодым клеткам.

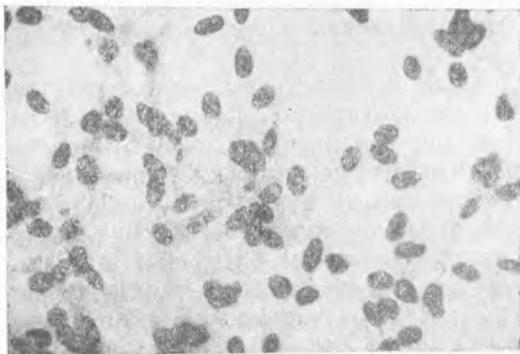


Рис. 3. Фибробласты, в которых гранулы были растворены в соде. Абсолютный спирт, эозин-азур

В течение первых суток выращивания клеточная плазма в культурах с краской окрашивается столь же интенсивно, как в контрольных, между тем как число синих гранул в них уже становится значительным. Отсюда следует, что материал гранул в известной степени образуется клеткой заново; это уже было найдено раньше на других тканях и у других видов животных (², ⁶). На поздних стадиях масса материала гранул часто несоразмерно велика по сравнению с исходной базофилией.

На препаратах, фиксированных в абсолютном спирте, гранулы растворяются в течение одного часа в 0,1—0,2% растворе углекислого натрия. После тщательной промывки культур в проточной воде (24 часа), короткой обработки разведенной соляной кислотой для восстановления окрашиваемости ядер, новой промывки в воде и окрашивания в азур-эозине, клетки культур приобретают такой вид, как на рис. 3. Все гранулы растворены, цитоплазма едва окрашена в лиловато-серый цвет. Ярко окрашены одни ядра. В отдельных культурах, впрочем, не все гранулы растворяются полностью; на их месте остаются ацидофильные зернистые глыбки. Такие же глыбки были отмечены при просмотре нескольких культур, не обработанных содой. Эозином они окрашивались ярче, чем азуром. Их содержание может быть только продуктом физиологического разрушения анаболитов, как всякого постороннего материала внутри клетки. Это свидетельствует о присутствии в гранулах каких-то механизмов (очевидно, энзимов, фосфатаз), отщепляющих от рибонуклеиновых кислот их фосфорнокислую группу.

Накопление витальной краски в форме более плотных гранул свойственно преимущественно внутренней части зоны роста культуры. В периферической зоне на поздних стадиях клетки содержат краску в виде крупных и более жидких вакуолей. На фиксированных и окрашенных

препаратах остаются пустоты, стенки которых изнутри усажены осадком анаболитов. Отделение этих последних из цитоплазмы здесь происходит трудней, чем во внутренней зоне.

Во всех культурах, которые были отобраны для более подробного исследования, клеточные тела, ядра и ядрышки имели вполне нормальный вид и нормальную окрашиваемость. Никаких существенных различий между ядерной структурой в экспериментальных и в контрольных культурах нельзя было найти после тщательного просмотра нескольких сотен клеток. Насколько можно было судить при бледном тоне окраски, одинаковый эффект дала и реакция Фельгена. В живых окрашенных культурах отсутствовал основной признак паранекротического повреждения: диффузная окраска ядра и цитоплазмы. На фиксированных препаратах культур признаки повреждения (клязматоз, распад или некроз ядер и т. д.) встречались в эксперименте лишь немногим чаще, чем в контроле.

Самым значительным последствием отделения рибонуклеиновых кислот соединений из метаболической цитоплазмы и их устранения из обмена веществ является подавление клеточных делений, т. е. остановка клеточного роста. Уже на вторые сутки клеточные деления сокращаются по сравнению с контрольными культурами, а на третьи сутки часто исчезают совсем. Митозы нормального строения часто содержат гранулы кринома, но всегда сохраняют базофилию плазмы. Профазы очень редки. Рост, т. е. увеличение числа клеток путем делений, ограничивается преимущественно первыми, частью вторыми сутками. Дальнейшее увеличение зоны роста могло бы идти только за счет клеточной миграции. Это справедливо и для культур, растущих в разведении краски 1 : 60 000, т. е. в разведении, не нарушающем механизма митоза. Замедление роста будет подробней анализировано в другой статье.

Результаты этого исследования подтверждают все найденное прежде на органах и тканях головастика⁽²⁾ и на костном мозге кролика⁽⁴⁾.

Институт цитологии, гистологии
и эмбриологии
Академии Наук СССР

Поступило
25 I 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Б. В. Кедровский, ДАН, 2, № 5 (1934). ² Б. В. Кедровский, Биол. журн., 5, № 5—6, 1137 (1937). ³ Б. В. Кедровский, Усп. совр. биол., 12, № 3, 468 (1940). ⁴ Б. В. Кедровский, Журн. общей биол., 1, № 2, 317 (1940). ⁵ Б. В. Кедровский, Усп. совр. биол., 15, № 3, 295 (1942). ⁶ N. Chlopin, Arch. exper. Zellforsch., 4, No. 4, 462 (1927). ⁷ I. Brachet, C. R. Soc. Biol. (Paris), 133, 80, 90 (1940); Arch. de biol., 53, No. 2, 207 (1941). ⁸ T. Caspersson and I. Schultz, Nature, 143, 602 (1939). ⁹ T. Caspersson, Naturwissensch., 29, 33, (1941). ¹⁰ A. Nagel, Z. Zellforsch., 10, 744 (1930). ¹¹ W. v. Mollendorff, ibid., 23, No. 5, 746 (1936). ¹² L. Gehry, ibid., 33, 86 (1943).