

М. Н. МЕЙСЕЛЬ, Л. Ф. ЛАРИОНОВ и Т. М. КОНДРАТЬЕВА

ПРИЖИЗНЕННОЕ ФЛУОРОХРОМИРОВАНИЕ ТКАНЕЙ, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ВНЕ ОРГАНИЗМА

(Представлено академиком А. И. Опариным 19 XII 1950)

Прижизненная окраска растительных и животных объектов слабо токсичными красителями тиазиновой и оксазиновой группы с последующим микрокопированием в белом свете является, как известно, важным методом для изучения структурных и функциональных особенностей и состояний живого вещества, клеток, тканей и органов. Однако для получения достаточно отчетливых результатов обычно требуется довольно значительное накопление этих красителей в определенных участках тканей или клеток. Концентрации красок для их обнаружения в ряде случаев должны быть настолько высокими, что явно изменяют или нарушают нормальную жизнедеятельность объектов. Набор красителей, пригодных для прижизненной обработки тканей, не особенно велик и разнообразен; ряд клеточных структур (например, ядра) трудно поддается в нормальных условиях прижизненной окраске.

Эти затруднения в значительной степени устраняются при исследовании люминесценции живых тканей, обработанных растворами флуоресцирующих индикаторов — флуорохромов. Флуорохромами могут служить разнообразные вещества как окрашенные, так и бесцветные, обладающие способностью связываться с определенными частями живых клеток или тканей и придавать им характерную люминесценцию. Достаточно ничтожных концентраций этих веществ в клетках или тканях, чтобы обнаружить их по интенсивному свечению, возникающему под влиянием ультрафиолетовых или синих лучей (1).

Прижизненное флуорохромирование было использовано для решения различных цитофизиологических вопросов на примере микроорганизмов (2) и высших растений (3). Ткани и органы животных очень слабо исследованы этим методом.

Мы изучали с помощью прижизненного флуорохромирования тонкую структуру живых нормальных и опухолевых тканей животных, культивируемых вне организма. В качестве объектов служили культуры естественного и перевиваемого рака молочной железы мышей, перевиваемой саркомы крыс, а также культуры из печени, сердца и подкожной клетчатки мышиных и куриных эмбрионов.

Культуры тканей особенно пригодны для люминесцентной микроскопии, так как клетки в них расположены в один ряд и достаточно прозрачны для лучей, возбуждающих свечение.

Опыты проводились двумя способами. В острых опытах одно- или двухсуточные культуры, выросшие на обычной среде, помещались на покровных стеклах в растворы флуорохрома различных концентраций (от 1 : 250 000 до 1 : 1 000 000) на 1—1½ часа при 38°. После короткого

промывания в растворе Рингера культуры переносились на предметное стекло и немедленно микрокопировались в белом и синем свете.

В длительных опытах флуорохромы прибавлялись к среде в момент посадки культуры; интенсивность роста культуры и ее люминесценция наблюдались в течение нескольких дней.

Наиболее избирательную и яркую люминесценцию живых тканей мы получили со следующими флуорохромами: акридином оранжевым, ауорофосфином и корифосфином. Эти флуорохромы в неодинаковой степени адсорбируются разными компонентами клеток и тканей, вследствие чего яркость и цветность свечения компонентов также оказываются различными.

Цитоплазма раковых клеток, фибробластов и макрофагов люминесцирует темнозеленым или серовато-зеленым. На этом фоне выделяются ярко светящиеся огненно-красные гранулы различной величины, особенно многочисленные, крупные и яркие у макрофагов. Эти гранулы надо думать, аналогичны тем, которые образуются в цитоплазме под влиянием прижизненной окраски нейтральным красным. Наряду с ними в раковых клетках и фибробластах обнаруживаются мельчайшие, иногда расположенные правильными рядами гранулки, различимые только благодаря их ярко красному свечению. Эти гранулки крайне неустойчивы: при ничтожных повреждениях клеток они тотчас же расплываются и исчезают.

Ядра люминесцируют чрезвычайно ярко светлозеленым. В ядрах раковых клеток обнаруживается богатая структура: ядрышки, гранулы средней величины и многочисленная весьма мелкая, но довольно ярко светящаяся зернистость, образующая основной структурный фон ядра. Довольно отчетливо светится и оболочка ядра. Следовательно, испытанные нами флуорохромы связываются не только с протоплазмой, но свободно проникают в ядра, накапливаются в них и сочленяются с ядерными нуклеопротеидами.

Ядра клеток, находящихся в различных фазах деления, имеют типичные для этих фаз ярко люминесцирующие светлозеленые структуры, совпадающие с теми, которые выявляются на фиксированных и окрашенных препаратах.

Ядра макрофагов светятся более ярко, чем ядра эпителия; структура в них более грубая и менее разнообразная.

Культуры тканей, как выяснилось в наших опытах, способны развиваться и при наличии в среде флуорохромов (акридин оранжевый, ауорофосфин) в указанных выше концентрациях; образующиеся тканевые мембраны с каждым днем увеличивались в размерах, не отличаясь в этом отношении от контрольных. После фиксации и гистологической окраски таких культур в них обнаруживались митозы в таком же примерно количестве, как и в контрольных культурах. Только при более высоких концентрациях (1 : 250 000 и 1 : 125 000) отмечалась задержка роста культур.

Люминесцентно-микрокопическая картина живых культур, растущих в присутствии флуорохромов, в общем такая же, как и при флуорохромировании в остром опыте. Это свидетельствует о том, что воздействие флуорохромов в испытанных нами концентрациях не вызывает серьезного повреждения клеток и обнаруживаемая структурированность цитоплазмы и ядер совместима с жизнью клеток и тканей. Какая часть протоплазматических и ядерных структур, наблюдаемых при флуорохромировании живых культур, возникает под действием флуорохромов, и какие структуры существуют как таковые, вне зависимости от реакции живого вещества на флуорохромы — этот вопрос не может считаться вполне выясненным. Как показали исследования, проведенные с ультрафиолетовым микроскопом ⁽⁴⁾ и позволившие обнаружить нуклеопротеиды в живых, не подвергнутых действию каких-либо химиче-

ских реактивов клетках, богатой структуры в ядрах неповрежденных нормальных и опухолевых клеток не обнаруживается.

Мы фиксировали контрольные и прижизненно флуорохромированные культуры 10% раствором формалина и окрашивали их гематоксилином или по методу Фельгена. При этом можно отчетливо обнаружить гораздо более богатую и резкую структурированность ядер в культурах, предварительно обработанных флуорохромами. Этот факт указывает на несомненное структурирующее действие флуорохромов на клеточный протопласт, включая и ядро. Примечательно, что это структурирование совместимо с продолжением жизнедеятельности. Обнаруженное нами структурирующее действие флуорохромов на протоплазму и ядра клеток не идентично обратимому повреждению клеток, известному под названием паранекроза.

Если флуорохромированные культуры подвергать действию гипотонического раствора Рингера, разведенного спирта или кислоты, то можно наблюдать у них типичный паранекроз, хорошо выявляемый при обычном микроскопировании в белом свете. В люминесцентный микроскоп при этом обнаруживается, что ядра клеток, находящихся в паранекрозе, в значительной мере утрачивают свою богатую и разнообразную структуру; свечение ядер становится хотя и более ярким, но диффузным, в ядрах сохраняется только несколько гранул средней величины. После перенесения таких культур в изотонический раствор Рингера клетки выходят из паранекротического состояния; при этом снова восстанавливается первоначальная богатая и разнообразная структурированность ядер. Таким образом, резкая структурированность ядер в клетках флуорохромированных тканей является своего рода «нормальным» состоянием их, а обратимое повреждение, их паранекроз, сопровождается обратимой гомогенизацией ранее структурированных ядер.

Вызываемое флуорохромами структурирование ядер в живых клетках может, следовательно, при некоторых функциональных состояниях утрачиваться, и это исчезновение структур, так же как и их возникновение, совместимо с жизнью клеток и тканей.

Вполне вероятно, что состояние временного структурирования интеркинетического ядра входит в число не только патологических, но и физиологических реакций клетки, как ответ на разнообразные воздействия, затрагивающие клетку и ткани в целом. Весьма вероятно также, что закономерности распространения в протопласте веществ, проникающих в клетку извне, их накопление в ядрах и прижизненное структурирование ядер, так отчетливо обнаруженные с помощью флуорохромов, свойственны не только реакциям протопласта на инородные вещества, но могут иметь место в определенных фазах нормального обмена веществ.

Итак, на примере культур тканей нами показаны: 1) совместимость прижизненного флуорохромирования с ростом ткани и размножением клеток, 2) свободное проникновение в ядра живых клеток и накопление в них ряда флуорохромов, 3) возникновение под влиянием флуорохромов подчеркнутого прижизненного структурирования протоплазматических и ядерных нуклеопротеидов, 4) обратимость этого структурирования и структурная гомогенизация ядер при паранекротическом состоянии.

Институт микробиологии
Академии наук СССР и
Центральный рентгенологический,
радиологический и раковый институт

Поступило
19 XII 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. Н. Мейсель, Микробиология, 16, 527 (1947). ² М. Н. Мейсель и Н. Б. Заварзина, Микробиология, 16, 394 (1947). ³ S. Strugger, Jenaische Zs. Naturwiss., 73, 97 (1940). ⁴ Л. Ф. Ларионов и Е. М. Брумберг, ДАН, 51, 267 (1946).