

М. Н. МЕЙСЕЛЬ и А. В. ГУТКИНА

ПРИМЕНЕНИЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ БЫСТРОГО ОБНАРУЖЕНИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ТКАНЯХ И ОРГАНАХ

(Представлено академиком Е. Н. Павловским 13 V 1953)

Люминесцентная микроскопия находит все более широкое применение в биологических и медицинских исследованиях как метод, позволяющий с исключительной отчетливостью и контрастностью выявлять особенности строения и химического состава микроскопических структур. Использование собственного свечения (первичной люминесценции) клеток и тканей и обработка их люминесцирующими веществами (вторичная люминесценция) открывают значительные возможности для весьма тонкой структурной и функциональной характеристики исследуемых объектов (¹).

Люминесцирующие «красители» (флуорохромы) нередко избирательно связываются лишь с определенными клеточными и тканевыми структурами и веществами, придают им способность ярко светиться и тем самым способствуют их выявлению.

До настоящего времени в нормальной и патологической гистологии преимущественно используют для обработки флуорохромами фиксированные препараты. Фиксация, однако, в значительной мере обесценивает исключительные возможности тонкого и отчетливого выявления при помощи флуорохромов функционального состояния живого вещества, клеток и тканей. Фиксаторы, даже наиболее, казалось бы, мягкие и щадящие, чрезвычайно резко меняют структуры и физико-химические свойства живого объекта; они чаще всего нивелируют его наиболее существенные и характерные особенности. Поэтому во всех тех случаях, когда желательнее наиболее полное выявление функционального состояния тканей и особенностей распределения в них разнообразных веществ, необходимо прибегать к прижизненному флуорохромированию и люминесцентно-микроскопическому изучению живых и переживающих объектов.

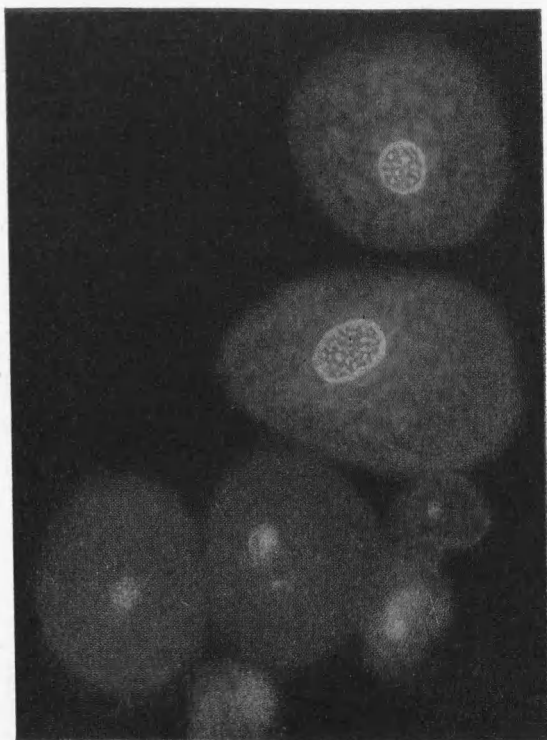
Прижизненная люминесцентная микроскопия уже дала существенные результаты при исследовании микроорганизмов и культивируемых вне организма нормальных и опухолевых тканей теплокровных животных (²). Естественным казалось применить этот метод для изучения патологических состояний тканей и органов человека, в первую очередь для распознавания опухолевых процессов. Микроскопические исследования мазков, отпечатков, соскобов и пунктатов широко используются в биологической и медицинской практике (³⁻⁵). Как правило, исследуемый материал при этом также подвергается фиксации и последующей окраске обычными цитологическими и гистологическими методами. И в этих случаях искажающее влияние таких обработок довольно значительно, к тому же они требуют заметной затраты времени. Некоторые авторы предлагают отказаться от каких-либо обработок и рекомендуют микроскопическое исследование свежих, необработанных препаратов. Изучение таких препаратов, однако, трудоемко и требует от исследователя большого опыта.

Мы испытали ряд способов применения люминесцентной микроскопии для изучения состояния живых тканей человека. Наилучшие результаты нам дала прижизненная люминесцентная микроскопия отпечатков, мазков, пунктатов и соскобов из исследуемых тканей. Мазки, пунктаты и поверхностные соскобы (последние производились очень маленькой ложечкой) тотчас же помещались на предметные стекла в сильно разведенные растворы флуорохромов (на физиологическом растворе). Уже через несколько минут такие прижизненно флуорохромированные препараты могут исследоваться под люминесцентным микроскопом. Любой биологический микроскоп может быть превращен в люминесцентный, если между сильным источником света (осветителем) и зеркалом микроскопа поместить жидкий или стеклянный синий светофильтр, а на окуляр — дополняющий его желтый светофильтр. Синий свет при такой установке возбуждает достаточно яркую люминесценцию препарата; избыток синих лучей, засвечивающих поле зрения и мешающих выявлению люминесценции объекта, устраняется желтым окулярным светофильтром. Наши наблюдения показывают, что для возбуждения люминесценции препаратов, флуорохромированных акридиновыми соединениями, синяя часть спектра имеет несомненные преимущества перед ультрафиолетовой.

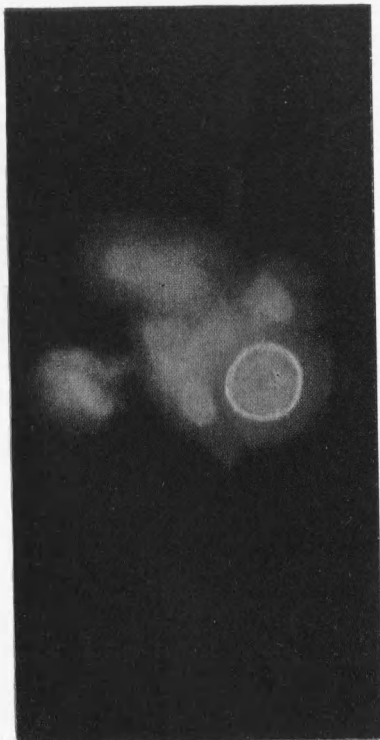
Из числа испытанных нами различных флуорохромов лучшими для нашей цели оказались акридин оранжевый и корифосфин в водных растворах (в разведении 1:25 000). В прижизненно обработанных такими растворами препаратах отчетливо дифференцируются эпителиальные и соединительнотканые клетки, форменные элементы крови и гноя и разнообразные микроорганизмы. Уже при малых увеличениях микроскопа можно быстро и точно ориентироваться в характере препарата, состоянии исследуемой ткани и наличии подозрительных атипических элементов. При средних увеличениях удается с достаточной отчетливостью различить нормальные и отклоняющиеся от нормы тканевые элементы, затрачивая на это минимальное время.

Особенно хорошо дифференцируется прижизненным флуорохромированием плоский эпителий слизистых оболочек. Протоплазма эпителиальных клеток, в зависимости от их состояния, люминесцирует от тускло-зеленого до оранжево-красного и даже интенсивно красного. Нормальные, зрелые эпителиальные клетки обычно отличаются зеленым свечением протоплазмы. Ядра светятся очень ярко светлозеленым; в них выявляется разнообразная структурированность: отчетливо видны ядерные оболочки, зернистые внутриядерные структуры, фигуры деления (рис. 1, а на вкл.). Более молодой эпителий обладает нежно структурированными, мелкогранулярными ядрами; с возрастом и по мере продвижения эпителиальных клеток в поверхностные слои структура их ядер становится более грубой. В случае патологических процессов в слизистой оболочке ядра эпителиальных клеток претерпевают характерные изменения, весьма близкие к уже описанным ранее паранекротическим изменениям ⁽⁶⁾ с постепенной утратой структур и гомогенизацией. В различных стадиях раздражения, обратимых повреждений и некробиоза эпителия можно видеть все градации нарушения состояния и структуры ядер с такой отчетливостью, которая недостижима при исследовании фиксированных и окрашенных препаратов.

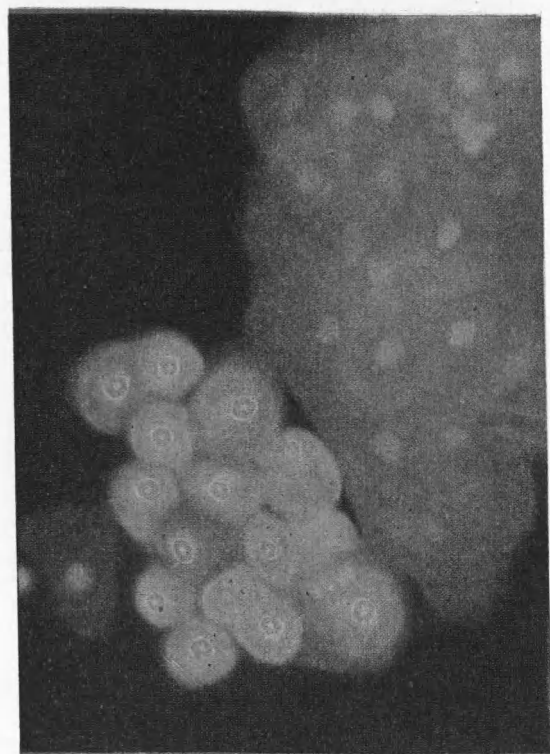
Не менее резкие изменения, связанные с функциональным состоянием, выявляются при помощи люминесцентной микроскопии и в протоплазме эпителиальных клеток. Флуорохромы по-разному связываются и придают различное свечение протоплазме молодых и более старых клеток, позволяют обнаружить самые начальные стадии ороговения, нарушения коллоидного состояния плазматических белков, накопления продуктов обмена веществ, изменения в количественном содержании рибонуклеиновой кислоты и рибонуклеопротеидов. Последние активно свя-



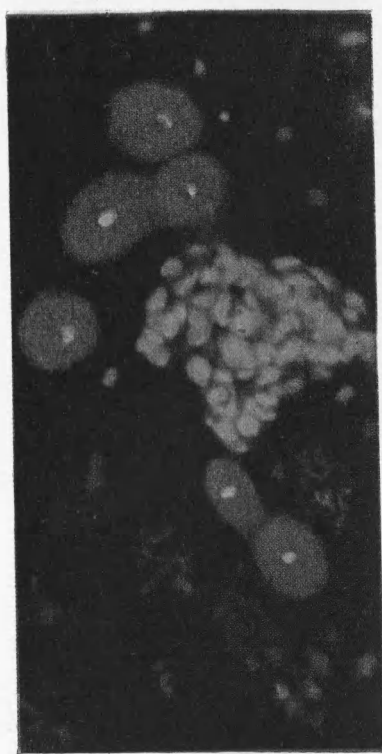
a



b



v



z

Рис. 1. Люминесцентно-микроскопические картины прижизненно флуорохромированных нормальных эпителиальных и опухолевых клеток (флуорохром — акридин оранжевый). *a* — нормальные эпителиальные клетки (мазок из гортани), *b* — раковая клетка (мазок из гортани), *v* — нормальный эпителий мочевого пузыря и группа раковых клеток (рак предстательной железы), *z* — группа раковых клеток среди клеток нормального эпителия (мазок из гортани)

зываются с такими флуорохромами, как акридин оранжевый и корифосфин, давая комплекс, ярко люминесцирующий различными оттенками оранжевого и красного. Благодаря этому в препарате удается просто и быстро различить возрастные и функциональные сдвиги в состоянии клеточных элементов эпителия, исследовать патологические изменения, возникающие в результате острых и хронических воспалительных и дегенеративных процессов.

Особенно четко и демонстративно выявляются методом прижизненной люминесцентной микроскопии атипические опухолевые клетки. Они гораздо энергичнее, чем нормальные клетки, адсорбируют флуорохромы, светятся ярче и цвет их свечения сдвинут в сторону красной части спектра. Уже при малых увеличениях микроскопа эти клетки могут быть быстро обнаружены вследствие более яркой люминесценции их обычно более крупных и полиморфных ядер, по розовому и оранжевому свечению протоплазмы. При средних и больших увеличениях удается без труда подтвердить ненормальный, атипичный характер таких клеток с их не в меру крупными, пузыревидными, нередко неправильной формы ядрами, отличающимися грубо-ячеистой структурой, крупными розовыми или даже красными ядрышками (рис. 1, б). Протоплазма таких клеток обычно светится белесовато-розовым или светлооранжевым; в ней нередко можно отметить разнообразные включения, светящиеся яркокрасным. Эти особенности свечения протоплазмы опухолевых клеток указывают на нарушения в их нуклеиновом обмене, на накопление нуклеиновых кислот рибозного типа, хорошо выявляемые акридиновыми флуорохромами.

Мы обследовали значительное количество больных, страдающих раком гортани, миндалин, пищевода, мочевого пузыря, предстательной железы и шейки матки. Во всех без исключения случаях прижизненная люминесцентная микроскопия мазков, отпечатков или пунктатов позволяла быстро (уже через несколько минут) и вполне достоверно обнаруживать атипичные клетки. Цветные микрофотоснимки с некоторых из этих препаратов представлены на прилагаемых микрофотографиях. На рис. 1, в, г отчетливо видно, насколько резко отличаются флуорохромированные опухолевые раковые клетки от нормальных эпителиальных клеток, будучи исследованы даже при сравнительно небольших увеличениях микроскопа.

Более подробно полученные нами данные по прижизненному флуорохромированию тканей и клеток будут изложены в специальных публикациях. Здесь же мы хотим подчеркнуть, что метод прижизненной люминесцентной микроскопии с успехом может быть применен для определения морфофункционального состояния тканей животных и человека. Этот метод можно рекомендовать для выявления различных патологических отклонений в структуре и функциях тканей и клеток и особенно для быстрого обнаружения атипических опухолевых элементов при исследовании экскретов, мазков, отпечатков и пунктатов. Он выгодно отличается от методов обычной цитодиагностики своей простотой и четкостью получаемой картины, позволяющей без особого труда быстро различать ненормальные, атипичные клеточные формы.

В заключение мы хотели бы выразить благодарность проф. В. К. Трутневу за активное содействие в проведении этой работы.

Институт микробиологии Академии наук СССР и

Поступило
10 IV 1953

Научно-исследовательский институт
уха, горла и носа
Министерства здравоохранения РСФСР

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ М. Н. Мейсель, Изв. АН СССР, сер. физ., 15, № 6, 788 (1951). ² М. Н. Мейсель, Т. М. Кондратьева, Н. А. Помощникова, Журн. общ. биол., 12,

№ 5, 312 (1951). ³ А. Я. Альтгаузен, Диагностика злокачественных новообразований при микроскопическом исследовании секретов и экскретов, 1948. ⁴ Е. Я. Ставская, Д. В. Левина, Цитологический метод диагностики рака, 1952. ⁵ Г. Л. Дозорцева, Функциональная диагностика в акушерстве и гинекологии на основе цитологических исследований, Минск, 1952. ⁶ М. Н. Мейсель, Л. Ф. Ларионов, Т. М. Кондратьева, ДАН, 76, 723 (1951).