

Г. А. КОСТЕНКО, Л. Л. ЛИТИНСКАЯ, А. М. ВЕКСЛЕР, Л. Х. ЭЙДУС

## СИНХРОННЫЕ КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ КЛЕТОК АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

(Представлено академиком Г. М. Франком 8 II 1973)

Изменение функциональной активности организма или отдельных органов сопровождается закономерным изменением размеров соответствующих клеток и ядер. Так, установлено, что суточное изменение функциональной активности приводит к ритмическому увеличению размеров ядер клеток печени мыши (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>), гипоталамуса мыши (<sup>3</sup>) и др. (<sup>4</sup>). Точно так же увеличение содержания нуклеиновых кислот и белка в пейроглии шейного ганглия кошек в результате длительных инъекций адреналина (<sup>5</sup>) сопровождается увеличением размеров глиальных клеток (<sup>6</sup>).

Таким образом, лабильность геометрических параметров клеток (ядер) является важной характеристикой не только морфологических, но и функциональных особенностей клеток, органов или организма в целом. С этой точки зрения представляет интерес анализ геометрических параметров опухолевых клеток в динамике. В литературе имеются только единичные работы, посвященные исследованию данного вопроса. Например, обнаружены ритмические изменения объемов клеток феохромоцитомы (при культивировании фрагментов надпочечников собак) с периодом около 2 час. (<sup>7</sup>). Близкие по длительности колебательные изменения размеров зарегистрированы у ядер клеток гемацитобластов человека при миелоидном лейкозе (<sup>8</sup>), у клеток культуры НЕр-2 (<sup>9</sup>), а также у ядер клеток асцитной карциномы Эрлиха (а.к.Э.) (<sup>10</sup>).

Целью данной работы являлось изучение морфологических параметров целостных клеток а.к.Э. в динамике, выяснение взаимоотношений колебаний размеров ядер и клеток а.к.Э. и установление общих закономерностей этих процессов.

Культура а.к.Э. пассировалась на белых беспородных мышах весом 18—20 г. В эксперименте использовался а.к.Э. на седьмой день роста. Через определенные временные интервалы измерялись значения следующих клеточных параметров: размеры клетки и ядра, сухого веса клетки и прочности плазматических мембран. Методика приготовления препаратов определялась видом измеряемого параметра и требованиями измерительных устройств (<sup>10—15</sup>).

Определение динамики размеров клеток а.к.Э. проводилось в фиксированных пробах с помощью прибора целлоскоп-101 (<sup>11</sup>) с переделанной монотрической системой и с помощью системы машинного анализа геометрии микрообъектов (м.а.г.м.о.) (<sup>12</sup>). Средний размер клеток при прижизненных исследованиях оценивался по величине сопротивления клеточной суспензии (<sup>13</sup>). Площадь ядер определяли с помощью системы м.а.г.м.о.

Исследование динамики параметров клеток а.к.Э. позволило установить, что размеры клеток и ядер а.к.Э. меняются во времени синфазно со средним периодом 60—90 мин. и размахом ( $\xi$ ) по площади сечения порядка 20% (рис. 1). Вариабельность длительности периодов и размаха колебаний в различных опытах при измерении размеров клеток показана на рис. 2.

Изменение размеров клеток а.к.Э. сопровождается синфазным изменением проницаемости клеточных мембран при противофазном изменении



их прочности. Прочность плазматических мембран оценивалась по числу разрушенных клеток, появляющихся в процессе высыхания мазка, разведенного непосредственно перед приготовлением любым низкомолекулярным раствором (физиологическим раствором, раствором Хенкса, сахарозы и т. д.). Причиной наблюдавшегося разрушения части клеток могли служить осмотические эффекты, обусловленные различием в скорости высыхания жидкости внутри и вне клеток. При разрушении плазматических мембран происходило резкое разбухание ядер, которые легко идентифицировались на мазке благодаря своим размерам, менее четкому контуру и ярко выраженной гранулярной структуре. Определение доли разрушенных клеток осуществлялось путем подсчета относительного числа «голых» ядер ( $n_{г.я.}$ , %) при наблюдении неокрашенного мазка, фиксированного метиловым спиртом, в обычном микроскопе в проходящем свете. Рис. 3 иллюстрирует синфазный характер изменения относительного числа ядер и размера клеток а.к.Э. во времени. Увеличение числа ядер свидетельствует о снижении прочности плазматических мембран.

Прямых измерений проницаемости клеточных мембран мы не проводили. Однако некоторые выводы можно сделать из сопоставления результатов измерения размеров клеток а.к.Э. различными методами. В тех случаях, когда регистрируемая величина является функцией не только размера клетки, но и проницаемости клеточной мембраны (метод электропроводности клеточной суспензии, измерение с помощью целлюскопа), размах колебаний размеров клеток уменьшается. Это может быть обусловлено синфазным изменением размера клеток и проницаемости плазматических мембран.

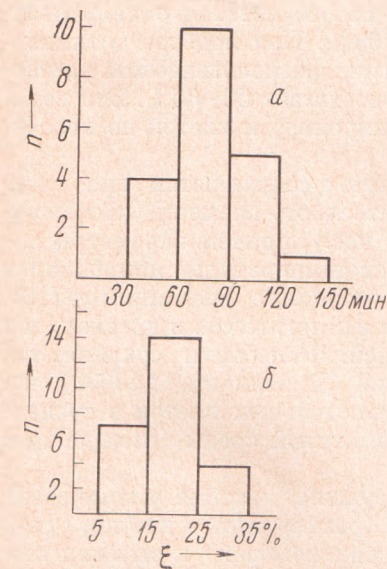


Рис. 2. Вариабельность величины периода (а) и размаха (б) колебаний размеров клеток а.к.Э. в различных опытах

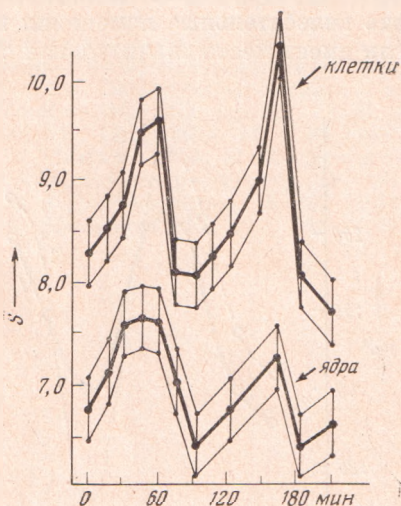


Рис. 1. Изменение средних размеров ядер и клеток а.к.Э. во времени

Изменение размеров клеток а.к.Э. сопровождается противофазным изменением их сухого веса. Сухой вес клеток определялся с помощью сканирующего и интегрирующего интерференционного микроскопа <sup>(14)</sup>. Измерения проводились на фиксированных неокрашенных мазках. Следует заметить, что колебания сухого веса, наблюдаемые в данных условиях, еще не означают паличтия периодичности в интенсивности основного метаболизма клеток. Результаты, представленные на рис. 4, получены при изменении сухого веса клеток на мазках, фиксированных метиловым спиртом. Известно, что в этом случае происходит вымывание из клеток липидов, водорастворимых белков и др. <sup>(15)</sup>. Если к

тому же проницаемость клеточных мембран меняется синфазно размерам клеток, то наблюдаемые изменения сухого веса могут быть следствием раз-



личной степени вымывания веществ из клетки, определяемой свойствами мембраны в каждый момент времени.

Колебания параметров клеток характеризуются высокой степенью синхронности и значительной автономностью. Действительно, используемые нами статистические методы измерения дают возможность зарегистрировать колебательные изменения параметров клеток только в том случае, если имеет место значительная синхронность клеток в популяции. Нижний

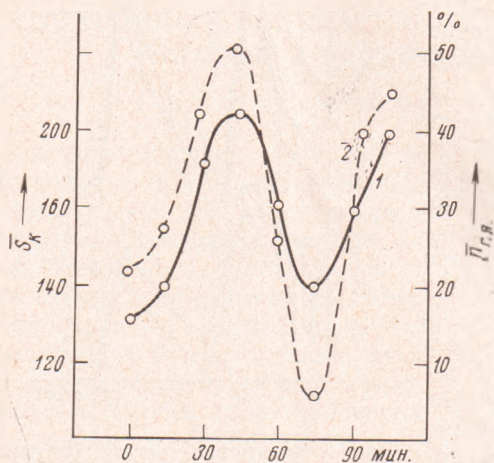


Рис. 3

Рис. 3. Изменение среднего размера клеток (1) и среднего числа ядер (2) во времени в популяции а.к.Э.

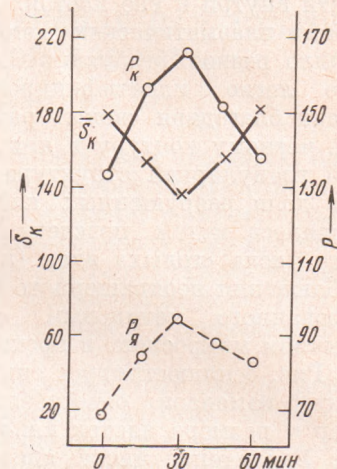


Рис. 4

Рис. 4. Изменение средних размеров и сухого веса (P) ядер и клеток а.к.Э. во времени

предел синхронности может быть определен по результатам оценки прочностных характеристик плазматических мембран. При подборе оптимальной величины разведения клеточной суспензии физиологическим раствором размах колебаний доли ядер на мазках достигает 50–60%. Эта величина и определяет минимальную степень синхронности клеток по колебательному изменению их параметров.

Колебательные изменения параметров клеток сохраняются при инкубации суспензии а.к.Э. *in vitro* в течение длительного времени (прослеживались при инкубации суспензии а.к.Э. до 8 час.), причем параметры колебаний — период и размах — мало зависят от температуры инкубации в пределах изменения ее от 18 до 37°. Резкое затухание колебаний при 12° может быть объяснено как угнетением обменных процессов в клетках, так и их частичной или полной десинхронизацией. Колебания сохраняются при очень значительном разведении суспензии (до величин 1 : 16000), которое неминуемо приводит к обособленности отдельных клеток в суспензии и означает почти полную замену инкубационной среды (измерения с помощью целлоскопа).

Таким образом в популяции а.к.Э. обнаружены часовые ритмические изменения некоторых клеточных параметров (размер ядра и клетки, сухой вес, проницаемость и прочность плазматических мембран) и высокая степень синхронности при сохранении автономности колебаний клеток в популяции.

# ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> T. Caspersson, J. Holmgren, Anat. Anz., 79, H 1/4, 553 (1934).
- <sup>2</sup> O. Bucher, Biol. Latina, 14, 1, 1 (1961).
- <sup>3</sup> T. Niebroj, Naturwiss., H. 3, 67 (1958).
- <sup>4</sup> H. Klug, Naturwiss., H. 4—5, 141 (1958).
- <sup>5</sup> L. Z. Pevzner, J. Neurochem., 12, 12, 993 (1965).
- <sup>6</sup> Л. З. Певзнер, Л. Л. Литинская, Цитология, 10, 7, 812 (1968).
- <sup>7</sup> J. Castero, A. Chever et al., Tex. Rep. Biol. and Med., 23, 1, Suppl., 213 (1965).
- <sup>8</sup> Л. Л. Литинская, Автоматические методы определения геометрических параметров клеток и клеточных ядер, Кандидатская диссертация, Л., 1967.
- <sup>9</sup> А. М. Векслер, Л. Л. Литинская и др., Прижизненные измерения клеток в культуре тканей с помощью сканирующих микроскопов. В сборн. Сканирующая техника в исследовании клеточных популяций, клеток и органоидов, М., 1973, стр. 25.
- <sup>10</sup> В. М. Митюшин, Л. Л. Литинская, Л. Б. Кампир, Биофизика, 12, 1, 89 (1967).
- <sup>11</sup> Инструкция к прибору «Целлоскоп».
- <sup>12</sup> А. К. Шмаков, А. П. Анисимов, Г. Р. Иваницкий, В сборн. Статистические свойства микроструктур, М., 1971, стр. 54.
- <sup>13</sup> Г. А. Костенко, Х. М. Касумов и др., Биофизика, 16, 865 (1971).
- <sup>14</sup> Н. И. Поляков, А. Ф. Кузнецова и др., Цитология, 13, в. 5, 671 (1971).
- <sup>15</sup> В. Я. Бродский, Цитология, 2, 5, 605 (1960).