

Б. А. ЕЗДАНЫН

О ДЕСТРУКТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ  
ЖИЗНИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ДИФФУЗИОННЫХ  
КАМЕРАХ IN VIVO

В обычных условиях существования в организме опухолевые клетки ведут паразитический образ жизни и понятие о продолжительности их жизни из-за частых митозов лишается конкретности. Жизнь каждой клетки фактически ограничивается продолжительностью короткого интеркинеза, лежащего между двумя митозами. До сих пор не изучался вопрос о продолжительности жизни опухолевых клеток в условиях, искусственно создаваемых в организме, при которых они не имеют возможности размножаться, но способны поддерживать свою жизнеспособность. Между тем изучение именно такого длительного переживания *in vivo* может дать определенные отправные точки для понимания механизмов регрессии опухолей и даже некоторых вопросов прогрессии их, таких, как механизм рецидивов после операций, появления поздних метастазов и др.

Для получения необходимой экспериментальной модели мы решили прибегнуть к помощи диффузионной камеры. Клетки асцитной опухоли вместе с асцитической жидкостью помещались в камеру, в которую *in vivo* может диффундировать кислород и, возможно, некоторые питательные вещества из серозной жидкости, циркулирующей в полости живота.

Ранее диффузионные камеры в экспериментально-онкологических опытах применялись рядом исследователей [4—12]. Так, в многочисленных исследованиях Тейхмана и др. [10—14], помимо выяснения многих методических вопросов, связанных с изготовлением и применением диффузионных камер, показана исключительная перспективность этого метода исследования. Подбирая различные фильтры для изготовления диффузионных камер, исследователь имеет возможность проводить ценные вирусологические и иммунологические исследования в области онкологии.

В качестве примера могут служить исследования Бигсса и Айзелайна [2], выполненные на асцитной опухоли Эрлиха. Опыты ставились с целью изучения иммунологической активности асцитической жидкости опухоли Эрлиха. Результаты опытов показали, что эффективный антигенный материал, помимо клеток опухоли, находится в каких-то субклеточных образованиях («вирусные частицы»), имеющих величину более чем 0,1 мк.

Наши исследования проводились по следующей методике.

Диффузионные камеры изготавливались из пластинчатых (мембранных) фильтров № 2 (размер пор—0,5 мк, диаметр—35 мм). Для этого края фильтров по блестящей поверхности смазывались тонким слоем отечественного полимерного клея («наирит»), затем складывались таким образом, чтобы образовалась камера формы полукруга с зияющим отверстием на одном конце. После стерилизации камер в дистиллированной воде в течение 20—30 мин. при помощи шприца, не касаясь открытых краев камеры, в них помещалось 0,2—0,3 мл свежееизвлеченной асцитной опухоли Эрлиха. Затем края отверстия с внутренней поверхности смазывались клеем и заклеивались наглухо. Стерильная чашка Петри с закрытыми камерами ставилась в холодильник при температуре +4°C.

Операции на животных производились под эфирным наркозом при соблюдении всех правил асептики и антисептики. Брюшная полость вскрывалась разрезом длиной 2,5—3 см, чуть отступая от средней линии живота. Взяв камеру с опухолью за заклеенный край, осторожным движением вводили ее в брюшную полость поверх кишок. Затем непрерывным швом зашивали рану—подкожные ткани, кожу. При наличии специального приспособления для наркоза и при некотором навыке операция длится всего 10 минут.

Наша попытка подвергнуть микроскопическому изучению изготовленные камеры на целлоидиновых срезах, предпринятая главным образом с целью определения характера полимеризованного склеивающего «наирита», не увенчалась успехом. При гистологической проводке камер через батарею спиртов возрастающей крепости основное вещество камеры уже в 96° спирте растворялось и через сутки от нее оставались только рыхлые хлопья. Интересно, что такого явления мы не наблюдали при заливке в целлоидин камер, извлеченных из организма животных.

При вскрытии животных диффузионные камеры оказывались или лежащими совершенно свободно поверх кишечных петель (а иногда между ними), или были фиксированы в том или ином месте в результате прирастания к ним сальника, складки брюшины на придатке семенника, края печени, петель кишок и т. д.

При изучении гистологических срезов мы убедились в том, что стенка диффузионной камеры и заклеенный участок никогда не инфильтрируются, даже в тех случаях, когда камера бывает замурована в приросших к ней органах и окружена воспалительным инфильтратом значительной толщины (рис. 1, 2).

Из 25 мышей, подвергнутых описанной операции, 2 мыши пали на следующий же день, 22 жили от 4 до 54 дней, а одна мышь жила 6 мес. и была забита нами для определения состояния диффузионной камеры.

Через 24 ч. после помещения диффузионной камеры с асцитной опухолью Эрлиха в брюшную полость отмечаются уже выраженные деструктивные изменения опухолевых клеток. Микроскопическая картина при окраске мазков метилгрюн-пиронином указывает на то, что опухо-

левые клетки значительно беднеют рибонуклеопротеидами. В большинстве клеток деструктивные изменения протекают по литическому типу [1], т. е. при сохранении всей цитоплазмы резко падает ее пиронинофильность в результате исчезновения зерен рибонуклеопротеидов. Это приводит к тому, что в популяции опухолевых клеток появляется множество

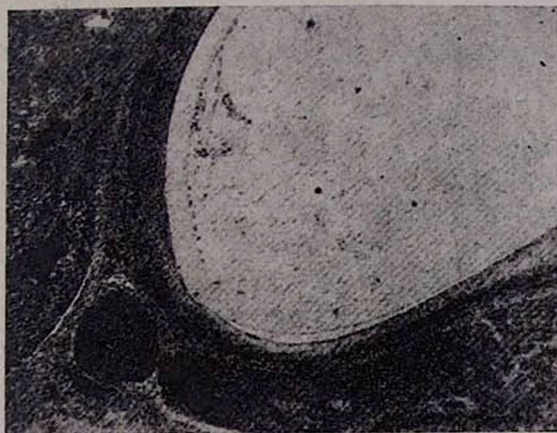


Рис. 1. Участок диффузионной камеры с приросшими к ней органами (ув. 40X).



Рис. 2. Заклеенный участок диффузионной камеры с воспалительным валом вокруг (в центре — слой полимерного клея) (увел. 60X).

уже полностью оголившихся ядер. В значительной части клеток отмечаются другие изменения, которые могут быть охарактеризованы как частичное разрушение цитоплазмы клеток. Это происходит путем образования у них лопастных отростков, в которых концентрируется пиронинофильная субстанция цитоплазмы, с последующим отпадением их от клетки. Описанный процесс имеет некоторое сходство с разрушительно-литическим типом деструкции клеток, но характерные микроскопические

картины этого типа деструкции не встречаются. В препаратах имеются структуры «взрывного» типа деструкции в количестве, характерном для интактной опухоли, и, судя по окраске, они подвергаются постепенному лизису. Митотические фигуры уже через сутки от начала опыта исчезают из популяции клеток.

Через четверо суток микроскопическая картина опухоли, переживающей *in vivo*, становится довольно своеобразной. На фоне преобладания голых ядер, находящихся на различных стадиях лизиса, видны уцелевшие опухолевые клетки различной величины—от 10 до 40—50 мк. Цитоплазма этих клеток более базофильна, чем в опытах через 24 ч., и окрашивается пиронином в розовый цвет. Ядро в большинстве клеток расположено эксцентрично и окрашивается довольно интенсивно. Оно, как правило, имеет неправильную форму и крупнозернистое строение. Нередко наблюдаются клетки, которые по состоянию ядра могут быть отнесены к клеткам, находящимся в ранних фазах митоза. Однако ввиду полного отсутствия в препаратах последующих стадий митоза (анафазы, телофазы) правильнее допустить, что такие клетки могут проделывать только эндомитотическое разделение ядра. Об этом также говорит присутствие дву- и многоядерных клеток в относительно большем количестве, чем в исходной опухоли.

Интересно, что в этот срок опыта в препаратах появляется некоторое количество новых структур «взрывного» типа деструкции. Они ясно отличаются от таковых в интактных опухолях. Главное отличие заключается в том, что здесь фактически происходит только фрагментация ядра и внутри этих структур не удается обнаружить характерных фиолетовых частиц, содержащих достаточное количество обеих нуклеиновых кислот (ДНК и РНК).

Дальнейшие изменения, происходящие в опухоли, приводят к тому, что к 8—12 суткам в препаратах обнаруживаются преимущественно те клетки, которые уцелели после частичных разрушительных процессов. Эти клетки выглядят более базофильными, чем в ранние сроки опыта, однако большей частью они имеют неправильную форму, в их цитоплазме имеются вакуоли. Процесс вакуолизации особенно сильно поражает цитоплазму многоядерных клеток. Чаше, чем в ранние сроки опыта, попадают структуры, характерные для «взрывного» типа деструкции.

В последующие сроки опытов (до 25 суток) наблюдается определенное усиление пиронинофильности уцелевших опухолевых клеток. Базофилия цитоплазмы усиливается настолько, что часто не удается рассмотреть подробности строения ядра даже при иммерсионных системах микроскопа. Создается впечатление, что увеличивается также относительное количество многоядерных клеток в опухолевой популяции. Последние становятся все больше и больше и могут достигать до 100 и более мк в диаметре. С другой стороны, в эти сроки опыта чаще наблюдается картина разрушения многоядерных и одноядерных, но по величине больших клеток. Интересно, что попадают даже совершенно голые ядра, или группа ядер, принадлежащие многоядерной клетке, в ко-

торых обнаруживаются несколько (а иногда и многочисленные) сильно базофильных ядрышек. Последние значительно гипертрофированы и почти всегда содержат мелкие вакуоли. Таких ядрышек мы никогда не встречали в клетках интактных опухолей в процессе их деструкции.

После 25 суток вновь усиливаются процессы регрессии и к 35—40 дням в содержимом диффузионных камер остается очень небольшое количество опухолевых клеток. Базофилия цитоплазмы мелких клеток выражена уже очень слабо, а многоядерные клетки сильно вакуолизированы и находятся в процессе разрушения.

В последующие сроки (до 54 суток) в препаратах, приготовленных из скудного содержимого диффузионных камер, обнаруживаются только единичные ядра нейтрофильных лейкоцитов.

Для постановки биологических проб (целью которых было определение продолжительности жизнеспособности опухолевых клеток Эрлиха) из диффузионных камер при помощи шприца в стерильных условиях отсасывалось содержимое и вводилось одной интактной мыши. В случае, если жидкость оказывалась густой, тягучей, она разбавлялась стерильным физраствором в пропорции 1 : 3, 1 : 4.

Во все испытанные сроки (до 35 суток включительно) после инокуляции интактным мышам содержимого диффузионных камер мы наблюдали появление асцитных опухолей. До 20 суток опухолевые клетки не только остаются в диффузионных камерах живыми, но и оказываются способными вызывать выраженные асцитные опухоли почти в обычные сроки—в течение 10—14 дней, после чего появление асцитной опухоли начинает задерживаться; в наблюдении, где мы вводили содержимое диффузионной камеры через 35 суток со дня опыта, асцитная опухоль появилась только через 34 дня.

Изучение асцитных опухолей, появившихся после инокуляции мышам содержимого диффузионных камер, показало, что они ничем существенным не отличаются от обычной асцитной опухоли Эрлиха. Отмечается только заметное усиление в их первых пассажах деструкции клеток по литическому и разрушительно-литическому типам по нашей классификации [1].

Переходя к обсуждению результатов опыта по изучению переживания опухолевых клеток *in vivo*, следует прежде всего уточнить условия, в какие попадают опухолевые клетки, помещенные в диффузионные камеры. По-видимому, правильнее считать, что в диффузионных камерах существуют только минимальные условия для поддержания жизнеспособности клеток. Эти условия недостаточны для того, чтобы популяция опухолевых клеток могла размножаться дальше; большинство клеток погибает в первые же сутки пребывания в диффузионной камере. Механизм их гибели в основном не отличается от того, что наблюдается при кратковременном переживании клеток этой же опухоли *in vitro* при температуре +37°C. На этом основании можно предположить, что вначале причиной гибели клеток является увеличение концентрации сильнодействующих метаболитов вокруг них. Однако если в

условиях переживания *in vitro*, начиная с 5—6 ч. от начала опыта, наступает аноксия, приводящая в течение нескольких часов к гибели остальных клеток, то в диффузионных камерах создаются относительно благоприятные условия для существования клеток. Итак, судя по продолжительности жизни клеток (до 35 суток), которая превосходит продолжительность жизни клеток, переживающих *in vitro* более чем в 100 раз, можно считать оправданным существующее мнение, что применение диффузионных камер представляет собой своего рода культивирование *in vivo*.

Исходя из того, что в диффузионных камерах постепенно уменьшается их содержимое, а в последние сроки опытов они оказываются вовсе пустыми, можно считать, что через их стенку происходит только односторонняя диффузия жидкости — из камер в брюшную полость. Таким образом, гибель клеток в поздние сроки опыта происходит в результате недостатка питательных веществ, но в аэробных условиях. Интересно, что в указанных условиях изменяется характер базофилии опухолевых клеток: с одной стороны, в промежутке времени от 5 до 25 суток цитоплазма уцелевших клеток больше насыщается пиронинофильными веществами, чем это имеет место в интактной опухоли, с другой — эти пиронинофильные вещества теряют свой зернистый характер и пропитывают цитоплазму клеток диффузно. По-видимому, указанную микроскопическую картину можно объяснить тем, что опухолевые клетки в условиях диффузионной камеры не имеют возможности размножаться и передавать синтезированные белковые вещества дочерним клеткам. Об этом же свидетельствует образование многоядерных клеток в результате эндомитотического деления их ядер. В этом можно усмотреть постепенную утрату опухолевыми клетками своих злокачественных свойств. Так, по Каудри [3], опухолевые клетки «...удаляются из «потока злокачественности», образуя гигантские клетки, которые сами по себе незлокачественны».

### В ы в о д ы

1. Жизнеспособность опухолевых клеток Эрлиха в условиях переживания в диффузионных камерах *in vivo* сохраняется примерно в течение 35 суток.

2. Гибель опухолевых клеток при этом происходит преимущественно по литическому и частично по «взрывному» типам деструкции клеток. В диффузионных камерах клетки лишены возможности размножаться из-за недостатка питания, однако большинство уцелевших клеток в условиях длительного переживания не теряет своих злокачественных свойств.

3. Неблагоприятные условия существования вызывают превращение части уцелевших клеток в многоядерные гигантские клетки, которые сами по себе незлокачественны.

Բ. Ա. ԵՋԴԱՆՅԱՆ

ԴԻՖՈՒԶԻՈՆ ԿԱՄԵՐԱՆԵՐՈՒՄ IN VIVO ՈՒՌՈՒՑՔԱՅԻՆ ԲՋԻՋՆԵՐԻ  
ԴԵՍՏՐՈՒԿՏԻՎ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԵՎ ԿԵՆՍԱՏԵՎՈՒԹՅԱՆ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ն փ ու մ

Դիֆուզիոն կամերաներում in vivo կենսազրկման պայմաններում էպիթելիալ ուռուցքային բջիջների կենսունակությունը պահպանվում է մոտ 35 օրվա ընթացքում: Այդ դեպքում ուռուցքային բջիջները մահանում են դեստրուկցիայի գերազանցապես լիտիկ և մասնակիորեն «պայթումային» տիպերով: Դիֆուզիոն կամերաներում սննդի պակասության հետևանքով բջիջները զրկված են բազմաանալու հնարավորությունից, սակայն երկարատև կենսազրկման պայմաններում պահպանվող բջիջների մեծամասնությունը չի կորցնում իր շարորակ հատկությունները:

Դոյություն անբարենպաստ պայմաններում պահպանվող բջիջների մի մասը վեր է ածվում բազմակորիզ հսկա բջիջների, որոնք առանձին վերցրած շարորակ չեն:

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Езданян Б. А. Журнал экспериментальной и клинической медицины АН Арм. ССР. 1968, 8, 6, 85.
2. Biggs M. W. a. Eiselein J. E. Cancer Research, 1965, 25, 11, 1888.
3. Cowdry E. V. Раковые клетки. М., 1958.
4. Gabourel J. D. a. Fox K. E. Cancer Research, 1959, 19, 1210.
5. Hays E. F. Proc. Soc. Exptl. Biol. a. Med., 1964, 117, 1, 45.
6. Jeejeebhoy H. E., Delorme E. J., Alexander P. Transplantation, 1966, 4, 4, 397.
7. Merwin R. M., Redmon L. W., Algire G. H. J. Nat. Cancer Inst., 1964, 33, 1, 110.
8. Parrish W. a. Kleinfeld R. G. Cancer Research, 1963, 23, 1164.
9. Shelton E. J. Nat. Cancer Inst., 1964, 32, 3, 709.
10. Teichmann B. Z. Naturforschung, 1964, 196, 1089.
11. Teichmann B. Naturwissenschaften, 1965, 52, 3, 65.
12. Teichmann B., Wittig G. Naturwissenschaften, 1963, 50, 21, 673.
13. Teichmann B., Wittig G. Naturwissenschaften, 1964, 61, 7, 169.
14. Teichmann B., Wittig G., Vogt R. Z. Naturforschung, 1964, 196, 58.