

Електронномікроскопічне вивчення процесу адаптації клітин до культивування поза організмом

В. А. Шуклінов, Н. Д. Осиньковська, В. П. Козир

Лабораторія етіології і профілактики пухлин Київського науково-дослідного інституту експериментальної і клінічної онкології

Основною особливістю життєдіяльності клітин при експлантації є їх автономне існування у відсутності впливу регулюючих систем організму.

До останнього часу вважалось, що в умовах навіть тривалого культивування поза організмом клітини зберігають властиві їм біологічні і морфологічні особливості. Проте дослідження, проведені за останні роки, показали, що в штучно створених умовах існування порушується обмін речовин культивованих клітин і наслідком цього є зміна їх структури.

В літературі є вказівки [1], що навіть при нетривалому культивуванні посилюються гліколітичні процеси та ослаблюється тканинне дихання в клітинах.

Деякі автори [3], застосовуючи цитохімічні методи дослідження, показали, що клітини ниркового епітелію на початку експлантації майже позбавлені включень нейтрального жиру, який нагромаджується поступово в процесі культивування.

За літературними даними [7], протягом першої доби спостерігається нагромадження дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) і рибонуклеїнової кислоти (РНК) в клітинах, які піддають культивуванню. Є також вказівки на те, що активність сукцинат-СТ-редуктази ДПН-Н і ТПН-Н-нітро-СТ-редуктази і цитохромоксидази на різних етапах культивування фібробластів виражена різно.

Дослідженнями, проведеними в 1962 р. [2], було показано, що ізолювання клітин з організму супроводжується глибокою перебудовою всього клітинного обміну, що проявляється, насамперед, у зниженні активності таких ферментів, як сукциндегідрогеназа, ДПН-, ТПН-діафораза в першу добу і підвищенні їх активності, починаючи з третьої-четвертої доби експлантації.

Особливий інтерес становить вивчення тонких морфологічних змін, що відбуваються в клітинах при тривалому культивуванні.

Методика досліджень

Для експлантації використовували суспензію клітин, одержану шляхом трипсинізації шкірно-м'язової тканини новонароджених щурят 0,25%-ним розчином трипсину за методикою, запропонованою Янгнером [8]. Культивування проводили на серевовищі 199 з додаванням 10%-ної телячої сироватки й антибіотиків у флаконах Карреля (Д-6,0).

Для дослідження клітини вирощували на покривних скельцях. Фіксацію здійснювали в рефрижераторі 2%-ним розчином чотириокису осмію за методом Колфельда [5]. Після зневоднення в спиртах наростаючої міцності препарати вміщували в суміш Н-бутил-метилметакрилатів (4:1) з додаванням 1%-ного перекису бензоїлу. Полімеризацію проводили в термостаті при 55°C протягом 24 год. Ультратонкі зрізи виготовляли на ультратомі системи Нікловітца і вивчали в електронному мікроскопі ЕМ-5.

Результати досліджень

При мікроскопічному дослідженні культур через 24 год на скельці були виявлені клітини, що прикріпились, більшість з яких була округлої форми, деякі клітини мали відростки і розташовувались поодинокі або групами по п'ять-шість клітин.

Помітне збільшення рігати вже через 48 з'єднуючись між собою, розкопичному дослідкою, яка виразно вищим, ніж внутрішній



Рис. 1. Жива куліна мікроскопія

різної величини. Ну осміюфільною речовини скупчень зерен.

В цитоплазмі міккулуму у вигляді синими на їх поверхні форми з чітко окресдані в різних ділянках.

Суцільний клітин тивування. На цей ч складалась із клітин з відростками різної перебували в стадії по

При електронно глибини і форми в'я світах яких можна бу.

У цьому періоді ний поліморфізм міто

Деякі мітохондрії матрикс і безладно і

Ергастоплазматич форми, на поверхні рибонуклеїнових гран куди утворюючи скуп

Помітне збільшення клітин, що прикріпились, можна було спостерігати вже через 48 год. Клітини групувались і утворювали сстрівці, з'єднуючись між собою за допомогою відростків. При електронномікроскопічному дослідженні було видно, що ядра клітин оточені оболонкою, яка виразно складалась з двох шарів: зовнішній був більш тонким, ніж внутрішній. Оболонка деяких ядер мала виступи і западини



Рис. 1. Жива культура. П'ята доба культивування. Фазово-контрастна мікроскопія. Культура має виражену гістоморфну будову.
Збільшення 10×20 .

різної величини. Нуклеонема була представлена дрібногранулярною осміофільною речовиною. Ядерця неправильної форми і складались із скупчень зерен.

В цитоплазмі містилась велика кількість ендоплазматичного ретикулу у вигляді системи каналців і сплосчених лакун з прикріпленими на їх поверхні гранулами РНП. Нечисленні мітохондрії овальної форми з чітко окресленими поперечними перегородками були розкидані в різних ділянках цитоплазми.

Суцільний клітинний шар утворювався на п'яту-шосту добу культивування. На цей час культури мали типову гістоморфну будову і складались із клітин різних типів, серед яких переважали фіброblastи з відростками різної довжини. Виявлялась велика кількість клітин, що перебували в стадії поділу.

При електронномікроскопічному дослідженні виявлялись різної глибини і форми вп'ячування ядерних оболонок всередині ядер, в про-світах яких можна було бачити елементи цитоплазми.

У цьому періоді культивування привертала до себе увагу виразний поліморфізм мітохондрій і значні коливання їх розмірів.

Деякі мітохондрії були неправильної форми, мали ущільнений матрикс і безладно розташовані внутрішні перегородки (рис. 2).

Ергастоплазматична сітка мала вигляд пазирків різної величини і форми, на поверхні мембран розташовувались зерна РНП. Частина рибонуклеїнових гранул розташовувалась вільно в цитоплазмі, подекуди утворюючи скупчення.

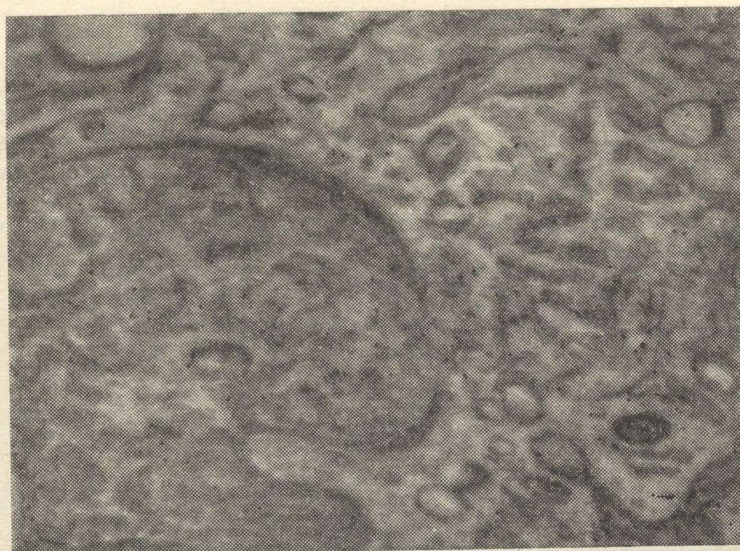


Рис. 2. П'ята доба культивування. Ділянка клітини. Вп'ячування ядерної оболонки. Велика кількість вільно розташованих гранул РНП. Мітохондрії зміненої форми.
Збільшення 16000.

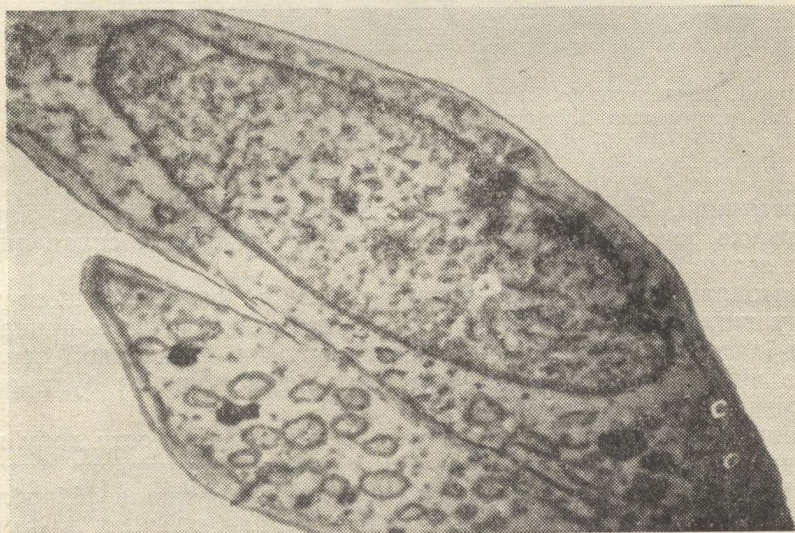


Рис. 3. Тридцята доба культивування. Значне розширення ергастоплазматичних каналців. Цитоплазма збагнена структурними елементами.
Збільшення 12000.

У культурах першого пасажу (8—16-а доба культивування) переважали дозрілі фібробласти з відростками різної довжини. В цьому періоді була виявлена значна кількість неправильних мітозів. Часто можна було бачити амітози.

При електронномікроскопічному дослідженні в цей період культивування не було помічено таких виражених вп'ячувань ядерних мембран, як у первинній культурі; більшість ядер була правильної форми.

Правильно розташовані каналцями правильної форми.

Овальні форми цих культур, про переходи чітко виражені значні скупчення.

На 30-у добу росту культур. Білі округлої форми. В цитоплазматичними структурами каналців (рис. 3).

перечні перегородки Клітини з такою добою культивування плантації траплялися ретикікуломі втягнуті; мітохондрії

Аналіз одержаних змінюється структурними і спроби

1. Гершанович В. І. Хімія, 1960, 23, 3, 453
2. Залкінд С. Я., 3
3. Изакова Л. П., Смиелита, 1959, 1, 379
4. Caulfield (1957)
5. Salzman H. P.—Ві
6. Youngner J. S.—

Електрошкір

Лабораторія ім. О.

В зв'язку з початком дослідження зумовленими тією частістю рефлекторного у свій час ще С. П. нення патологічного ності атеросклерозу та ін.] в своїх працях лексу і без виражен