Вплив великих доз антитестикулярної та антиоваріальної цитотоксичних сироваток на експлантати тканин

Л. І. Барченко

Лабораторія по вивченню дії біологічно активних речовин Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця Академії наук УРСР, Київ

Вчення про цитотоксичні сироватки як направлено діючі біологічні речовини зародилось в лабораторії І. І. Мечникова. В його розробці взяли участь як сам Мечников, так і його учні Борде, Ландштейнер, Чистович, Безредка та інші. Згодом цю тему розробляли численні вчені в усьому світі. Майже для всіх органів і тканин людського тіла було одержано цитотоксичні сироватки та вивчено їх дію. Найбільш детально була досліджена О. О. Богомольцем та його учнями дія антиретикулярної цитотоксичної сироватки. Дія багатьох органних цитотоксичних сироваток вивчена значно менше.

При введенні цитотоксичної сироватки в організм антитіла, які в ній є, вступають у сполучення з антигеном, якими в даному випадку є складові елементи тієї тканини або органа, проти якого сироватка одержана. Тому становить великий інтерес вивчення безпосереднього впливу цитотоксичної сироватки на живі клітини того органа або тканини, які послужили антигеном для її одержання.

Великі можливості для вивчення цього питання створив метод культур тканин. З того часу як цей метод дав можливість спостерігати безпосередню відповідь клітин на будь-який подразник, метод культур тканин широко використовується для досліджень у багатьох галузях біології та медицини. Має значення також те, що при застосуванні цього методу є змога проводити як контрольні, так і дослідні спостереження на тканинах тієї самої тварини, що виключає можливість індивідуальних коливань. Крім того, цей метод дозволяє з необхідною точністю на основі даних, що характеризують ріст експлантатів, визначати силу впливу цитотоксичної сироватки на тканини.

Ці переваги методу культур тканин були оцінені багатьма дослідниками як в нашій країні, так і за кордоном і успішно використані для вивчення антиретикулярної цитотоксичної сироватки Богомольця та інших цитотоксичних сироваток (Р. Є. Кавецький, 1927, 1929; М. О. Гольдфарб, 1939; О. Д. Тимофієвський і С. В. Беневоленська, 1940, 1941, 1947; Д. Нівен, 1929; К. Помрат, 1945; Помрат і Анігстейн, 1944, 1945; Ш. Лю, В. Мак-Крорі і І. Флік, 1957; К. Хейбел, 1957, та ін.).

В наших дослідах ми також використали метод культур тканин для вивчення дії антитестикулярної цитотоксичної сироватки (АТЦС) на тканини сім'яника та антиоваріальної цитотоксичної сироватки (АОЦС) на тканини яєчника.

Методика досліджень

Цитотоксичні сироватки для щурів одержували шляхом імунізації кроликів сольовими екстрактами тканини сім'яника щура (для одержання АТЦС) і тканини яєчника щура (для одержання АОЦС). Титр антитіл в цитотоксичних сироватках визначали за реакцією зв'язування комплементу. Досліди проводили на експлантатах сім'яника та яєчника щурів. Для одержання експлантатів були використані тканини статевозрілих білих щурів віком три місяці. Тканини культивували у флаконах Карреля на поживному середовищі, яке складалося з розчину Тіроде, гусячої плазми, телячого ембріонального екстракту (додавали лише для зсідання плазми) та сироватки кінської крові. Цитотоксичні сироватки додавали в рідке поживне середовище і тому дози цитотоксичних сироваток обчислювали в процентах від загальної кількості рідкого поживного середовища у флаконі (наприклад, для одержання дози в 20% на 6 *мл* поживного середовища додавали 1,2 *мл* цитотоксичної сироватки). В наших дослідах були застосовані дози 5—10% і 20% цитотоксичної сироватки від кількості поживного середовища. У поживне середовище контрольних експлантатів додавали сироватку крові нормальних кроликів у такій же пропорції, як і цитотоксичну сироватку.

Ріст експлантатів за певний проміжок часу, однаковий для контрольних і піддослідних експлантатів, вимірювали шляхом замалювання обрисів посадженого шматочка тканини та його зони росту за допомогою мікроскопа і рисувального апарата. Величину замальованих площин вимірювали планіметром. На основі одержаних даних обчислювали індекс швидкості росту. Всі дані оброблені за варіаційно-статистичним методом. Наведені в таблиці дані індексів росту являють собою середні статистичні показники, обчислені на основі обробки результатів вимірювання росту 30—35 експлантатів.

Результати досліджень

Першим етапом наших досліджень було вивчення впливу великих доз АТЦС на експлантати сім'яника та АОЦС на експлантати яєчника. Показниками дії цитотоксичних сироваток на тканину були: ріст експлантатів і морфологічні зміни клітин зони росту та порушення їх розташування.

Може виникнути питання: чи є клітини зони росту експлантатів сім'яника та яєчника специфічними клітинними елементами цих органів чи це лише розростання клітин сполучнотканинної строми цих органів. В. Михайлов (1937) детально вивчив клітинний склад зони росту експлантатів сім'яника щура і простежив походження клітин зони росту, починаючи від внутрішніх частин посадженого шматочка тканини (на гістологічних зрізах) до краю зони росту. Автор прийшов до висновку, що зона росту експлантатів сім'яника складається переважно з сертолієвих клітин та невеликої кількості фібробластів і макрофагів. Два останні види клітин при наступному культивуванні зникають зовсім.

Культивування тканин яєчника різних тварин і людини проводили численні дослідники (К. П. Улезко-Строганова, 1935; Г. Хрущов і Н. Діомідова, 1937; Н. А. Колесникова, 1940; Шампі і Моріта, 1925; Гейм, 1928; Інграм, 1956). В характеристиці процесу росту експлантатів яєчника різними авторами розходження порівняно невеликі. Всі дослідники прийшли до висновку, що зона росту експлантатів яєчника складається з фолікулярних клітин, які утворюють своєрідного вигляду мембрани з «віконами». Сполучнотканинні елементи — фібробласти і макрофаги можна спостерігати лише в деяких місцях зони росту. При наступному культивуванні сполучнотканинні елементи зникають.

В наших дослідах клітинний склад зони росту експлантатів сім'яника та яєчника був цілком аналогічний описаному вищезгаданими авторами. Отже, можна констатувати, що зона росту експлантатів сім'яника та яєчника складається переважно із специфічних клітинних

елементів цих органів, і тому вони є цілком придатним об'єктом для вивчення дії антитестикулярної та антиоваріальної цитотоксичних сироваток.

Результати проведених дослідів наведені в таблиці.

Вплив великих доз цитотоксичних сироваток на ріст експлантатів

Назва цитотоксичної сироватки та її титр	Доза сироватки (в процентах від кількості поживного середовища у флаконі)	Яку тканину культивували	Індекс росту експлантатів		P	Ріст досліджуваних експлантатів в процентах від росту контрольних, прийнятого за 100 %
			контрольних	досліджуваних		
АТЦС 1 : 400	5	сім'яник	2,39±0,41	0,75±0,18	<0,01	31
АТЦС 1 : 1200	5	»	4,09±0,33	3,94±0,37	<0,05	96
АТЦС 1 : 400	10	»	2,39±0,41	0,80±0,25	<0,01	33
АТЦС 1 : 1200	10	»	4,09±0,33	1,35±0,29	<0,01	33
АТЦС 1 : 400	20	»	1,09±0,12	0,17±0,01	<0,01	19
АТЦС 1 : 400	20	»	1,72±0,13	0,61±0,03	<0,01	35
АТЦС 1 : 640	20	»	1,88±0,15	0,73±0,14	<0,01	38
АТЦС 1 : 800	20	»	1,71±0,22	0,65±0,05	<0,01	35
АТЦС 1 : 1200	20	»	4,09±0,33	0,65±0,08	<0,01	15
АОЦС 1 : 200	20	яєчник	5,12±0,41	0,62±0,06	<0,01	12
АОЦС 1 : 200	20	»	7,42±0,72	1,24±0,03	<0,01	16
АОЦС 1 : 400	20	»	6,87±0,57	1,08±0,13	<0,01	15
АОЦС 1 : 400	20	»	7,30±0,51	1,31±0,35	<0,01	17
АОЦС 1 : 400	20	»	4,65±0,41	1,19±0,10	<0,01	25

Щоб легше було порівнювати між собою дані різних дослідів, було підраховано, який процент становить ріст піддослідних експлантатів від росту контрольних експлантатів, прийнятого за 100%.

Результати дослідів показують, що ріст піддослідних експлантатів пригнічується під дією застосованих доз цитотоксичних сироваток. Пригнічення росту було досить значним. В окремих випадках ріст досліджуваних експлантатів становив лише 12—15% від росту контрольних експлантатів.

Про цитотоксичну дію великих доз цих сироваток на клітини свідчать і результати морфологічного вивчення зони росту експлантатів. Морфологічні зміни вивчали на гістологічних препаратах. Тотальні препарати експлантатів готували шляхом фіксації ростучих на целофановій плівці експлантатів за методом Шабадаш та наступного фарбування залізним гематоксиліном за Вейгертом. При вивченні морфологічних змін ми звертали увагу як на зміни безпосередньо в клітинах, так і на загальний вигляд зони росту експлантатів і характер розташування в ній клітин.

Зона росту контрольних експлантатів сім'яника щура складається в основному з тонких, витягнутих клітин веретеноподібної форми з ясною протоплазмою та овальним правильної форми ядром з двома-чотирма ядерцями. За дослідженнями Михайлова, ці клітини являють собою сертолієві клітини сім'яника. Характерні особливості має також загальний вигляд зони росту. Клітини, з'єднуючись своїми паростками, утворюють своєрідну петлисту сітку (рис. 1).

Додавання цитотоксичної сироватки в поживне середовище експлантатів, намічених для гістологічних досліджень, ми проводили через три доби після посадки, коли навколо посаджених шматочків тканини утворювалась помітна зона росту з великою кількістю клітин.

Досліди ставили в двох варіантах: 1) у поживне середовище експлантатів додавали відповідну цитотоксичну сироватку в дозі 20% сироватки від кількості рідкого поживного середовища; 2) в поживне середовище, крім цитотоксичної сироватки, додавали ще одну краплю свіжої сироватки крові морської свинки, яка містить в собі комплемент. Отже, ми прагнули перевірити, чи не викличе присутність додаткового комплементу більш тяжких морфологічних змін у клітинах або навіть повне їх зруйнування.

Експлантати для виготовлення гістологічних препаратів фіксували через 1—2—3—4 години та через 1—2—3—4—5 діб після додавання цитотоксичної сироватки в поживне середовище культивованих тканин. Разом з досліджуваними експлантатами одночасно в ті самі строки фіксували і контрольні експлантати, в поживне середовище яких додавали нормальну кролячу сироватку в такій же дозі, тобто 20% від кількості поживного середовища. Одночасно фіксували і експлантати, в поживне середовище яких, крім цитотоксичної сироватки, додавали також комплемент.

Уже через годину після додавання цитотоксичної сироватки з'явились перші ознаки ураження клітин експлантатів сім'яника. Це проявлялось насамперед вкороченням паростків, порушенням зв'язку між клітинами та округленням, стисненням самих клітин. Згодом з'являються більш помітні зміни. Вони досить різноманітні за своєю формою, але можна відзначити кілька таких, які зустрічаються частіше: поява вакуолей у клітинах, фрагментація ядер, своєрідне явище «спаювання» клітин у конгломерати, поява великої кількості детриту та уламків клітин. Утворення конгломератів клітин, можливо, є чимсь подібним до аглютинації еритроцитів перед їх гемолізом під впливом антиеритроцитарної цитотоксичної сироватки. Такі зміни в зоні росту і особливо наявність конгломератів клітин добре видно на рис. 2, де показана зона росту піддослідного експлантата сім'яника. Ступінь цих змін був однаковий в обох варіантах дослідів, тобто з додаванням і без додавання комплементу. Будь-яких ознак, які б свідчили про більш інтенсивну дію цитотоксичної сироватки в присутності додаткової кількості комплементу, ми не виявили.

Зона росту контрольних експлантатів яєчника (рис. 3) складається з великих полігональних клітин з ясною протоплазмою і округлим або овальним ядром. Клітини ростуть щільно зімкнуті своїми краями у вигляді суцільної мембрани (епітеліоїдний тип росту). В експлантатах яєчника морфологічні зміни також можна виявити через годину після додавання цитотоксичної сироватки. Правильний епітеліоїдний тип зони росту порушується, клітини втрачають зв'язок між собою, особливо по краю зони росту (рис. 4). Подекуди можна спостерігати «тіні» клітин, ядра яких лежать у сплюснутій неправильної форми напівпрозорій сітці. Змінюються також ядра клітин. В клітинах, розташованих

Рис. 1. Частина зони росту контрольного експлантата сім'яника.
Мікрофото. Фарбування залізним гематоксиліном за Вейгертом.

Рис. 2. Частина зони росту експлантата сім'яника після дії на нього великої дози АТЦС.
Мікрофото. Фарбування залізним гематоксиліном за Вейгертом.

Рис. 3. Частина зони росту контрольного експлантата яєчника.
Мікрофото. Фарбування залізним гематоксиліном за Вейгертом.

ближче до центра експлантата, вони тільки втрачають свою правильну округлу або овальну форму. В клітинах, розташованих ближче до краю зони росту, ці зміни більш інтенсивні. Ядра стають темними, зморщеними, а самі клітини набирають неправильної форми. Протоплазма в таких клітинах темна, пініста, має грубу структуру.

Щоб перевірити специфічність дії досліджених цитотоксичних си-

Рис. 4. Частина зони росту експлантата яєчника після дії на нього великої дози АОЦС.
Мікрофото. Фарбування залізним гематоксиліном за Вейгертом.

роваток, були проведені експерименти, в яких в одному і тому ж досліді порівнювали дію АТЦС в дозі 20% від кількості поживного середовища на експлантати сім'яника і експлантати інших органів тієї ж тварини (легені, селезінка, надниркові залози). Аналогічні досліди проведені для порівняння впливу великої дози АОЦС на експлантати яєчника та експлантати інших органів щура.

Проведені досліди показали, що великі дози АТЦС і АОЦС викликають пригнічення росту експлантатів гетерологічних для цитотоксичної сироватки органів (селезінки, легень, надниркових залоз), але в значно меншій мірі, ніж пригнічення росту експлантатів сім'яників та яєчників.

Крім того, були проведені досліди, в яких порівнювалась дія великих доз АТЦС і АОЦС на експлантати сім'яника та АОЦС і АЦС на експлантати яєчника. Результати цих дослідів вказують на те, що великі дози АЦС викликають значно менше пригнічення росту експлантатів сім'яника та яєчника, ніж такі ж дози АТЦС і АОЦС.

Одержані дані дозволяють вважати, що АТЦС та АОЦС впливають специфічно на відповідні тканини. Слід вважати, що слабкіше

виражена дія великих доз АТЦС і АОЦС на інші органи тієї ж тварини і дія великих доз АЦС на експлантати сім'яника та яєчника залежать від дії цитотоксичних сироваток за рахунок загальновидових антигенів. Ця дія виражена слабкіше і є фоном, на якому проявляється направлена органна дія цитотоксичних сироваток.

Висновки

1. Великі дози антитестикулярної цитотоксичної сироватки викликають різке пригнічення росту експлантатів сім'яника, а великі дози антиоваріальної цитотоксичної сироватки — експлантатів яєчника. Дія цитотоксичних сироваток є специфічною.

2. Великі дози антитестикулярної цитотоксичної сироватки викликають морфологічні зміни в експлантатах сім'яника, а великі дози антиоваріальної цитотоксичної сироватки — в експлантатах яєчника. Це проявляється в порушенні розташування клітин у зоні росту, в утворенні конгломератів клітин, зруйнуванні частини клітин з утворенням детриту та в морфологічних змінах дегенеративного характеру в клітинах.

ЛІТЕРАТУРА

Гольдфарб М. О., Мед. журн. АН УРСР, т. IX, в. 2, 1939, с. 371.
Кавецкий Р. Е., Медико-биол. журн., в. VI, 1927, с. 89; Труды I Всесоюзн. съезда патологов, 1929, с. 65.
Колесникова Н. А., Архив анат., гистол. и эмбриол., т. 23, № 1—2, 1940, с. 110.
Тимофеєвський О. Д., Беневоленська С. В., Мед. журн. АН УРСР, т. X, в. 4, 1940, с. 1115; Труды конфер. по ФССТ, К., 1941; Мед. журн. АН УРСР, т. XVI, 1947, с. 74.
Улезко-Строганова К. П., Сб. научн. трудов Центр. акушерско-гинекол. ин-та НКЗ, т. I, 1935, с. 58.
Хрущев Г., Диомидова Н., Биол. журн., 5, 1937.
Champy, Morita, Arch. exper. Zellforsch., 5, 1925.
Habel K., Ann. N. Y. Acad. sci., v. 65, N 4, 1957, p. 801.
Ingram D. L., J. of Endocrinol., v. 14, N 2, 1956, p. 155.
Liu Ch. T., Mc Crory W. W., Flick Y. A., Proc. Soc. Exptl. Biol. a. Med., 95, N 2, 1957, p. 331.
Michailov W., Z. Zellforsch., Bd. 26, H. 14, 1937, S. 174.
Niven Y. S. F., J. Path. a. Bact., v. 32, N 3, 1929, p. 527.
Pomerat C. M., Texas Rep. on Biol. a. Med., v. 3, N 3, 1945, p. 404.
Pomerat C. M., Anigstein L., Science, v. 100, N 2603, p. 456; Feder. Proc., v. 4, N 1, 1945, p. 56.

Надійшла до редакції
14.V 1964 р.

Действие больших доз антитестикулярной и антиовариальной цитотоксических сывороток на эксплантаты тканей

Л. И. Барченко

Лаборатория по изучению действия биологически активных веществ Института физиологии им. А. А. Богомольца Академии наук УССР, Киев

Резюме

Для изучения непосредственного действия антитестикулярной (АТЦС) и антиовариальной (АОЦС) цитотоксических сывороток на ткани семенника и яичника был использован метод культур тканей.

Эксплантаты тканей семенников и яичников крыс культивировались во флаконах Карреля на питательной среде, в состав которой входили раствор Тироде, плазма крови гуся, телячий эмбриональный

экстракт и лошадиная сыворотка. Цитотоксические сыворотки, полученные путем иммунизации кроликов семенниками и яичниками крыс, добавлялись в жидкую питательную среду эксплантатов и дозировались в процентах от количества питательной среды во флаконе. Были испытаны дозы в 5, 10 и 20% от количества питательной среды. В питательную среду контрольных культур в таком же проценте добавляли сыворотку крови нормального кролика.

Действие цитотоксической сыворотки на ткань определялось по измерению роста изучаемых эксплантатов по сравнению с контрольными и по морфологическим изменениям клеток зоны роста.

Проведенные исследования показали, что испытанные дозы АТЦС и АОЦС оказывают сильное угнетающее действие на рост исследуемых эксплантатов семенников и яичников. В отдельных случаях рост подопытных эксплантатов составлял только 12—15% от роста контрольных эксплантатов. Наряду с этим, наблюдались отчетливые морфологические изменения, которые выражались в нарушении связи между клетками зоны роста, своеобразном явлении образования конгломератов клеток, разрушении части клеток, изменениях формы ядер и клеток. Результаты исследований позволили прийти к выводу, что большие дозы антиовариальной и антитестикулярной цитотоксических сывороток оказывают сильное цитотоксическое воздействие на клетки эксплантатов семенника и яичника.

Это действие является специфическим, так как на эксплантаты других тканей того же животного исследованные цитотоксические сыворотки оказывают гораздо менее выраженное действие, чем на эксплантаты семенника и яичника. Об этом свидетельствует также и то, что цитотоксическая сыворотка, полученная против других тканей (антиретикулярная цитотоксическая сыворотка), не оказывает такого сильного угнетающего действия на эксплантаты семенника и яичника, как антитестикулярная и антиовариальная цитотоксические сыворотки.

Effect of Large Doses of Antitesticular and Antiovarial Cytotoxic Serums on Tissue Explantates

L. I. Barchenko

A. A. Bogomoletz Institute of Physiology of the Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

To study the immediate effect of large doses of antitesticular cytotoxic serum on testicular cells and of antiovarial cytotoxic serum on ovary cells, the author used the method of tissue cultures.

The investigations showed that large doses of antiovarial and antitesticular cytotoxic serum greatly depress the growth of explantates of the testicle and ovary, morphological changes of a degenerative nature being observed in the cells. The data indicate that large doses of the investigated serums have a great cytotoxic effect on cells of the corresponding tissues. This effect is specific, since these cytotoxic serums have a much less pronounced effect on explantates of other tissues of the same animal. This is corroborated by the fact that cytotoxic serum against other tissues (antireticular cytotoxic serum) does not produce such a strong depressing effect on explantates of the testicle or ovary, as do antitesticular and antiovarial serum.