

УДК 615—365

В. П. Комісаренко, Ю. О. Спасокукоцький, М. В. Ільчевич,
І. С. Турчин, З. С. Голубович, М. К. Алексеєнко

ВПЛИВ АНТИКОРТИКОСУПРАРЕНАЛЬНОЇ ЦИТОТОКСИЧНОЇ СИРОВАТКИ НА СТРУКТУРУ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР КОРИ НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ СОБАК

Питання ціленаправлених змін функціонального стану залоз внутрішньої секреції, зокрема, надниркових залоз останнім часом привертає увагу багатьох науковців. До недавнього часу це були шляхи хірургічного видалення надниркових залоз при гіперкортицизмі або шляхи замісної гормональної терапії при зниженій функції цих залоз. Дослідженнями ряду авторів встановлено, що тривала стероїдна терапія при гіпофункції надниркових залоз приводила до атрофії коркової частини надниркових залоз з усіма негативними наслідками, а хірургічне видалення залози при підвищеній її функції не завжди приводило до бажаного результату.

Для вирішення питання направлених змін функціонального стану надниркових залоз ми керувались даними І. І. Мечникова [10], творчо розробленими О. О. Богомольцем [2, 3] та іншими авторами про можливість регуляції функції органів і систем організму при допомозі специфічних цитотоксичних сироваток.

Вперше О. О. Богомолець [4, 5] з допомогою гістологічних методів дослідження встановив, що в корковій частині надниркових залоз після введення специфічної сироватки наставали морфологічні зміни, що вказували на секреторний характер зрушень у надниркових залозах, однак, слід зауважити, що ці дослідження виконані з використанням сироваток, які мали антитіла як проти мозкової, так і проти коркової частини надниркових залоз.

Н. І. Панченко [12] були одержані активні специфічні цитотоксичні сироватки проти коркової та мозкової частин надниркових залоз, вивчено зміни функціонального стану надниркових залоз після введення різних доз антикортикосупраренальної цитотоксичної сироватки (АКСРЦС) і антимозкової супраренальної цитотоксичної сироватки у щурів та морських свинок. Вивчено вплив АКСРЦС на ріст перививних пухлин [14]. Дослідження згаданих авторів по вивченню дії цитотоксичних сироваток проводилось у дослідках *in vivo*.

Метою нашої роботи було одержання нової специфічної сироватки проти кори надниркових залоз собак, вивчення її імунологічної активності, визначення специфічності в серологічних реакціях зв'язування комплекменту та вивчення прямої дії на структуру клітинних культур кори надниркових залоз собак.

Методика досліджень

Одержання антикортикосупраренальної цитотоксичної сироватки. Антикортисупраренальну цитотоксичну сироватку (АКСРЦС) готували шляхом імунізації соляною суспензією клітин кори надниркових залоз собак. Суспензію клітин одержували

трипсинізацією шматочків кори надниркових залоз. Цим досягали повного зруйнування мозкової речовини і основної маси сполучнотканинних елементів. Оброблена в такий спосіб тканина кори надниркових залоз, тобто одержані клітини служили антигеном для імунізації кроликів. Імунізацію проводили «експресним» методом, розробленим Спасокукоцьким [15]. Титр сироватки визначали за реакцією Борде — Жангу в модифікації О. О. Богомольця [6].

Для встановлення специфічності АКСРЦС ставили перехресні реакції зв'язування комплекменту з гомологічним антигеном (клітини кори надниркових залоз собак); а також з цілою наднирковою залозою та негомологічними антигенами (нирка, печінка, серце, м'язи, селезінка, яєчник, сім'яник, легені).

Клітинні культури. Одношарові культури кори надниркових залоз собак готували з допомогою методу трипсинізації [8, 9]. В одну пробірку висівали по 800—900 тис. клітин на 1 мл живильного середовища. Клітини вирощували на шматочках прозорої слюди ($2 \times 0,5$ см) в живильному середовищі, що складалось з 50 частин 0,5% гідролізату лактальбуміну і 50 частин середовища 199, куди додавали 20% сироватки великої рогатої худоби. Клітини фіксували 96° етиловим спиртом, потім їх фарбували гематоксиліном Маєра та цитоплазму дофарбовували еозином. Об'єм ядер визначали за формулою $V = ab^2$, де a — великий радіус, b — малий радіус, які вимірювали з допомогою гвинтового окуляра-мікрометра. Результати дослідів обробляли статистичним методом Ойвіна [11].

Визначення стимулюючих та інгібуючих доз АКСРЦС. Розведеннями в живильному середовищі готували різні дози АКСРЦС 20; 10; 5; 1,25; 0,63; 0,31; 0,1; 0,05; 0,01; 0,001; 0,0002%, які потім вносили в пробірку з культурами. В контрольні пробірки додавали в таких же кількостях сироватку неімунізованого кролика (НКС). Для визначення кожної дози використовували по вісім пробірок з культурою. Оцінювали дію різних доз АКСРЦС через 48 год від моменту введення сироватки в пробірки.

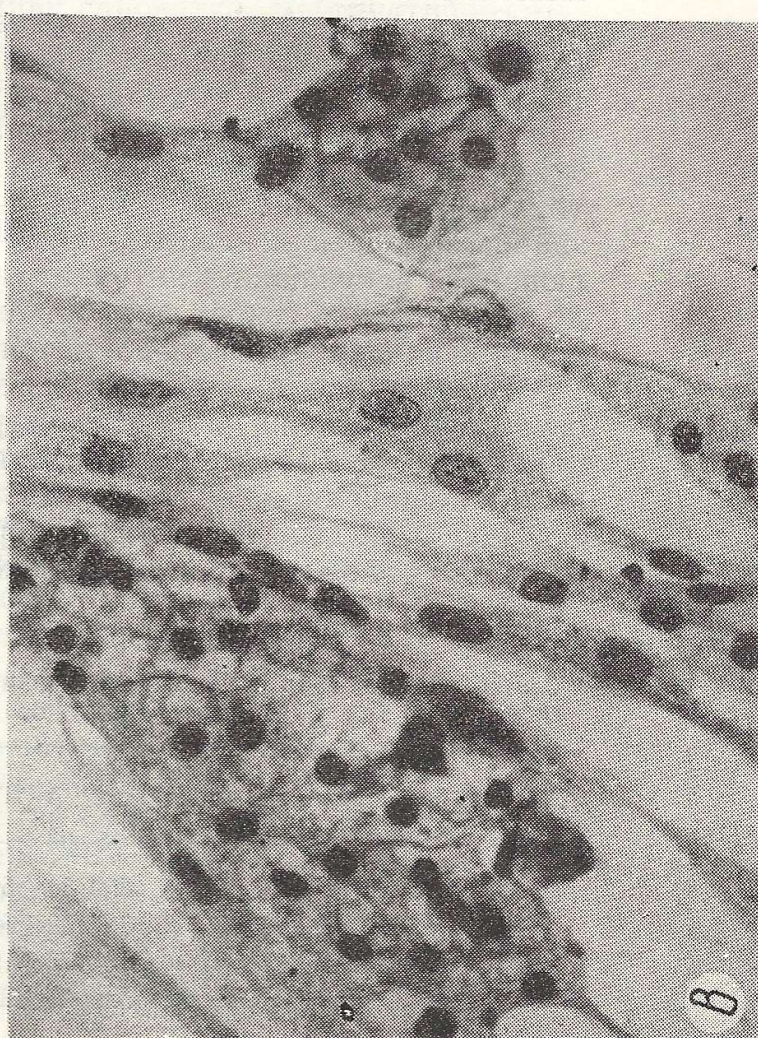
Відзначено, що АКСРЦС в дозі 20%, викликала повну дегенерацію клітин. Доза 10% спричиняла зруйнування 60% секреторних клітин, доза 5% — 50%, доза 2,5 — 30%, а 1,25% — 10%. Дози 0,63 і 0,31% не викликали видимих морфологічних змін у клітинах, що дозволило нам вважати їх субтоксичними.

Введення 0,1% АКСРЦС та менше приводило до стимуляції росту секреторних клітин, особливо це було помітно при внесенні АКСРЦС в дозі 0,05%. Найменшою дозою, ще здатною стимулювати ріст клітин культури кори надниркових залоз собак, була доза АКСРЦС 0,0002%. Виходячи з одержаних даних в дальших дослідях ми користувалися дозами 5 та 2,5% як інгібуючими, а дози 0,1 і 0,05% служили для вивчення стимулюючої дії АКСРЦС, що вносили в клітинну культуру кори надниркових залоз собак на четвертий-п'ятий день росту, коли утворювався суцільний шар клітин. Для контролю стимулюючої дії малих доз АКСРЦС в частину пробірок вносили АКТГ в концентрації 0,1 од/мл живильного середовища.

Результати досліджень

Нами одержано і використано для проведення дослідів сім серій АКСРЦС. Результати перехресних реакцій зв'язування комплекменту АКСРЦС для собак з метою визначення їх титрів наведені в табл. 1, з якої видно, що АКСРЦС вступали в реакцію зв'язування комплекменту з антигеном клітин кори надниркових залоз після трипсинізації в титрах 1:800, 1:640, 1:400, 1:320, 1:200, 1:100. З корою надниркових залоз титр використаних цитотоксичних сироваток близький до основного або такий же. З антигенами сім'яника, цілих надниркових залоз і мозковою їх частиною титри дуже близькі. Дані серологічних досліджень свідчать про наявність у складі АКСРЦС превалюючої кількості специфічних анти-тіл (цитотоксинів), продукованих на спеціалізовані клітинні елементи кори надниркових залоз. Крім серологічної характеристики АКСРЦС проведені досліди по вивченню впливу різних доз одержаних специфічних сироваток на структуру клітинних культур кори надниркових залоз собак.

На даному етапі дослідження (четвертий — п'ятий день росту) клітинна культура кори надниркових залоз собак складалась з епітеліальних (секреторних) клітин і поодиноких фібробластів). Серед епітеліальних клітин виділено два типи. Одні клітини були невеликих розмірів та мали полігональну форму, тісно прилягали одна до іншої, росли острівцями, що нараховували 15—20 клітин. Ядра їх круглі, гіперхромні, часті-



Клітинна культура кори надиркових залоз собак на п'яту добу росту.
 а — контроль, б — вплив 5% АКСРПС на клітинну культуру, в — вплив 0,01% АКСРПС на клітинну культуру.

Таблиця 1

Серологічна характеристика АКСРЦС в перекресних реакціях зв'язування комплекменту

Серія сироватки	Титри сироваток з антигенами собак											
	Клітини кори	Кора надниркових залоз	Мозкова частина надниркових залоз	Надниркова залоза	Нирка	Сім'яник	Яєчник	Селезінка	Серце	М'язи	Легені	Печінка
1	1:320	1:320	1:160	1:200	1:200	1:200		1:200	1:200	1:160	1:200	0
2	1:200	1:200	1:100	1:100	1:100	1:160		1:100	1:160	1:160	1:50	0
3	1:400	1:400	1:320	1:320	1:200	1:400	1:160	1:200	1:200	1:40	1:200	1:50
4	1:640	1:320	1:200	1:400	1:160	1:160	1:200	1:200	1:200	1:20	1:200	1:10
5	1:100	1:100	1:80	1:50	1:50	1:100	1:50	1:80	1:100	1:10	1:80	0
6	1:400	1:320	1:320	1:200	1:200	1:320	1:100	1:200	1:200	0	1:160	0
7	1:800	1:800	1:800	1:800	1:640	1:800	1:200	1:400	1:400	1:100	1:640	1:20

ше з одним чітким ядерцем, цитоплазма їх вакуолізована. Епітеліальні клітини другого типу більші, з чіткими контурами, відростчасті, розташовувались між острівцями у вигляді окремих клітин або груп. Ядра їх овальні або круглі з кількома ядерцями. Перинуклеарна зона цитоплазми компактна, а периферична — вакуолізована (див. рисунок, а).

Через 2 год після введення в живильне середовище культури різних доз АКСРЦС видимих морфологічних змін не виявлено.

Після введення АКТГ відзначається посилення вакуолізації цитоплазми обох типів епітеліальних клітин.

Стимулюючий ефект малих доз АКСРЦС починав проявлятися через 6 год з моменту введення специфічної сироватки. Це виявлялось у збільшенні ядер, чіткому розділенні цитоплазми на екзо- і ендоплазму, причому екзоплазма на цей час займає значну частину цитоплазми. АКТГ зумовлював аналогічні зміни в секреторних клітинах, однак слід вказати, що гормон, на відміну від стимулюючих доз АКСРЦС, викликав значне збільшення ядерця та ядер і під впливом його значно посилювалась вакуолізація цитоплазми. Інгібуючі дози АКСРЦС приводили до заокруглення секреторних клітин, зменшення розмірів ядер та ущільнення перинуклеарної зони в цитоплазмі.

Через 12 год після дії малих доз АКСРЦС збільшувалась кількість секреторних клітин, що росли острівцями та між ними. В острівцях їх нарахувалось до 30—35 та більше. Ядра всіх секреторних клітин збільшені в порівнянні з нормою, цитоплазма їх в міру вакуолізована.

Інгібуючі дози специфічної сироватки приводили до зменшення розмірів ядер секреторних клітин і самої їх кількості (табл. 2).

Таблиця 2

Зміни об'ємів ядер клітин кори надниркових залоз собак після дії АКТГ і різних доз АКСРЦС

Години	Контроль	АКТГ	2,5 % АКСРЦС	0,01 % АКСРЦС
6	696,07 ± 48,43	809,51 ± 59,46	281,88 ± 15,42	861,09 ± 66,04
12	697,81 ± 47,62	857,32 ± 52,22	319,89 ± 19,22	850,92 ± 13,23
24	718 ± 35,68	853,73 ± 19,01	393,42 ± 19,26	814,51 ± 49,84
48	699 ± 31,53	528,01 ± 22,29	328,73 ± 18,32	820,21 ± 22,36

В наступні строки (24 год) спостерігався паралелізм дії малих доз АКСРЦС і АКТГ. Продовжувалась вакуолізація цитоплазми і збільшення кількості секреторних клітин, особливо в острівцях. Слід вказати, що стимулюючий ефект росту секреторних клітин більше виражений під впливом малих доз АКСРЦС, ніж після дії АКТГ.

Інгібуючі дози АКСРЦС викликали дегенеративні зміни в частині секреторних клітин, причому на цей час міжострівцеві полігональні клітини зникають повністю, в центрі острівців розташована значна кількість пікнотичних клітин (див. рисунок, б).

Найбільш чіткий стимулюючий ефект дії малих доз АКСРЦС (див. рисунок, в) і АКТГ відзначено через 48 год після введення їх. В цей час острівці секреторних клітин інтенсивно розростались, клітини в них щільно прилягали одна до іншої. В частині острівців клітини росли в два і більше шари. На даному етапі дослідження не відзначено прогресуючих дегенеративних змін у секреторних клітинах під впливом великих доз АКСРЦС. Секреторні клітини, що залишались неушкодженими, не відрізнялись від контрольних. Близько 50% острівців епітеліальних клітин дегенерували повністю. Очевидно, інгібуючий ефект специфічної сироватки найбільш чітко виявляється через 24 год після її введення.

При дальшому вивченні впливу різних доз АКСРЦС і АКТГ на структуру клітинних культур кори надниркових залоз собак було відзначено, що в контрольній культурі через 96—120 год від початку досліду починали досить інтенсивно розмножуватись фібробласти. Секреторні клітини з часом заокруглювались і гинули шляхом пікнозу. Під впливом стимулюючих доз специфічних сироваток та АКТГ секреторні клітини зберігались на кілька діб довше, а розростання фібробластів наставало значно пізніше. При дії інгібуючих доз інтенсивне розмноження фібробластів спостерігалось після 48 год впливу сироватки. Деструктивні зміни секреторних клітин, що залишились після дії великих доз АКСРЦС, наставали в ті ж строки, що і в контролі.

НКС в таких же дозах як і АКСРЦС не викликали ніяких видимих морфологічних змін у клітинних культурах. Слід вказати, що вираженість дії і швидкість, з якою наставав інгібуючий ефект, залежали від титру досліджуваних сироваток. А саме, повний інгібуючий ефект при дії сироваток з титром 1:320 та 1:200 наставав через 48 год, а при дії АКСРЦС з титрами 1:640, 1:800 — через 24 год. Деструктивні зміни в клітинах чітко виражені при дії сироваток з більш високими титрами. Стимулюючий ефект був більшим при дії АКСРЦС з низькими титрами.

Обговорення результатів досліджень

Вивчено пряму дію АКСРЦС на клітинні культури надниркових залоз собак. Наші дослідження показали, що великі дози специфічної сироватки пригнічують ріст секреторних клітин, а малі стимулюють розвиток цих клітин. Досі подібні дослідження проводились тільки *in vivo* [7, 13]

Використовуючи метод культур тканин, можна вивчати пряму дію цитотоксичних сироваток на різні типи клітин у живій культурі. Нами раніше [8, 9] дана цитофункціональна характеристика клітинної культури нових залоз дорослих собак. Однак, не була вивчена зональна приналежність окремих клітин кори надниркових залоз у культурі. Як показали наші дослідження, клітинна культура надниркових залоз собак складається з епітеліальних (секреторних) клітин і фібробластів. Секреторні клітини, що ростуть острівцями невеликих розмірів з гіперхромним ядром, віднесені нами до клітин клубочкової зони, а клітини, що

ростуть острівцями і більших розмірів — до клітин пучкової зони. Клітини сітчастої зони ідентифікувати важко, оскільки вони подібні до клітин пучкової зони. Виявилось, що до дії інгібуючих доз АКСРЦС більш чутливі клітини пучкової зони; здебільшого через 24 год від моменту введення 5 і 2,5% АКСРЦС вони зникали повністю.

В результаті проведених дослідів встановлено, що великі дози АКСРЦС (20%) вже в перші години з моменту введення сироватки викликали повне зруйнування клітин кори надниркових залоз собак шляхом лізису.

В цьому випадку можна погодитися з думкою про те [16], що великі дози специфічних сироваток підвищують проникність лізосомальних мембран та сприяють виходу гідролітичних ферментів у цитоплазму клітини і це приводить до її лізису. Дослідження Барченко [1] показали, що великі дози специфічних сироваток підвищують проникність мембран лізосом, стимулюють активність лізосомальних ферментів, що приводить до виходу їх у цитоплазму клітин в тканинних культурах сім'яників та яєчників.

За теорією О. О. Богомольця [4], при введенні малих доз специфічних сироваток спостерігається зруйнування незначної кількості клітин з утворенням метаболітів, що стимулюють ріст клітин даного органа. Інші дослідники вважають, що малі дози цитосироваток сприяють утворенню специфічного лізосомального білка, який залежно від концентрації може стимулювати чи пригнічувати ріст клітин [17].

Для виявлення специфічних змін у клітинних культурах надниркових залоз собак під впливом стимулюючих доз цитосироваток служили культури, оброблені АКТГ. Встановлена різниця в дії цих обох біологічних стимуляторів. Стимулюючий ефект АКСРЦС наставав пізніше в порівнянні з дією АКТГ. Під впливом останнього відзначене різке збільшення ядер та більш значна вакуолізація цитоплазми. Ріст секреторних клітин був більш інтенсивним після введення малих доз АКСРЦС, а в деяких випадках спостерігався ріст клітин в кілька шарів, чого не відзначено після введення АКТГ. Отже, клітинна культура надниркових залоз собак є зручною моделлю для вивчення механізму дії цитосироваток.

Висновки

1. Вперше одержана антикортикосупраренальна цитотоксична сироватка для собак, специфічна по відношенню до клітин кори їх надниркових залоз.

2. АКСРЦС у великих дозах (2,5—5%) приводить до пригнічення росту клітин у клітинній культурі кори надниркових залоз собак та до значних деструктивних змін цих клітин.

3. АКСРЦС у малих дозах (0,1—0,05%) приводить до стимуляції росту клітин та поліпшення їх життєдіяльності.

4. В більшості випадків спостерігалась залежність між силою інгібуючого ефекту та титром цитотоксичної сироватки.

Література

1. Барченко Л. И. Распределение кислой фосфатазы в клетках культур тканей семенника и яичников после воздействия разных доз антитестикулярной и антиовариальной цитотоксических сывороток.— В сб.: Цитотоксины в соврем. мед. Киев, «Здоров'я», 1972, 6, 66—70.
2. Богомолец А. А. Методологическая ценность цитотоксинов как специфических стимуляторов.— Медико-биол. журн., 1926, 3, 35—40.
3. Богомолец А. А. О специфической цитотоксической стимуляции и блокаде клеточных функций.— Мед. журн. АН УССР, 1935, 4, 3—4, 447—456.

4. Богомолец А. А. К вопросу о микроскопическом строении и физиологическом значении надпочечных желез в здоровом и больном организме.— Одесса, «Техник», 1909, 193.
5. Богомолец А. А. К физиологии надпочечных желез. Супраренолизины.— Русский врач, 1909, 29, 972—978.
6. Богомолец А. А. К методологии реакции связывания комплемента.— Избр. тр., Киев, изд-во АН УССР, 1956, I, 248, 156.
7. Зайчик А. Ш., Перельман Л. Р. Цитотоксическая стимуляция коры надпочечников в норме и при гипотиреозе.— В сб.: Цитотоксины в соврем. мед., Киев, «Здоров'я», 3, 1966, 100.
8. Комиссаренко В. П., Турчин И. С., Радолицкая Л. С., Резников А. Г. Цитологическая и функциональная характеристика первично трипсинизированной клеточной культуры надпочечников плода человека.— Цитология и генетика, 1966, 4, 318—325.
9. Комиссаренко В. П. Цитологические и функциональные изменения в клеточной культуре надпочечников собак под влиянием АКТГ.— Проблемы эндокринологии, 1974, 3, 77—81.
10. Мечников И. И. Об иммунитете.— Русский архив патол., клин., мед., и бактериол., 1900, X, 4, 357.
11. Ойвин И. А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований.— Патол. физиол. и exper. терапия, 1960, 4, 76—85.
12. Панченко Н. И. До питання про взаємовідношення між корковою і мозковою речовинами надниркових залоз.— Фізіол. журн. АН УРСР, 1966, XII, 3, 321—326.
13. Панченко Н. И. Изменение функционального состояния корковой и мозговой частей надпочечников под влиянием антикортико- и антимозговой супраренальных цитотоксических сывороток. Автореф. дис. Киев, 1970, 30.
14. Самунджан Е. М., Голубович З. С. Рост перевивных опухолей на фоне применения антисупраренальной цитотоксической сыворотки.— В кн.: Онкология, Киев, «Здоров'я», 1974, 16—20.
15. Спасокукоцький Ю. О. Функціональні зміни організму під впливом застосування антиоваріальної та антитестикулярної цитотоксичних сироваток у віковому розрізі.— Фізіол. журн. АН УРСР, 1964, 10, 6, 709—719.
16. Bickes I., Quastel I., Vas S. Effects of Ehrlich ascites antisera on the biochemical activities of Ehrlich ascites carcinoma cells in vitro.— Cancer Res., 1959, 19, 6.
17. Ryan W. L., Carolin C. Lysosomal stimulation of Cells in tissue culture.— Proc. Soc. Exptl. Biol., and Med., 1967, 126, 1, 112—114.

Київський інститут ендокринології
та обміну речовин; відділ імунології
та цитотоксичних сироваток Інституту фізіології
ім. О. О. Богомольця АН УРСР, Київ

Надійшла до редакції
2.III 1976 р.

V. P. KOMISSARENKO, Ju. A. SPASOKUKOTSKIJ,
N. N. IL'CHEVICH, I. S. TURCHIN, Z. S. GOLUBOVICH,
I. K. ALEKSEENKO

EFFECT OF ANTICORTICOSUPRARENAL CYTOTOXIC SERUM ON THE STRUCTURE OF CELL CULTURES OF DOG ADRENAL CORTEX

Summary

The anticorticosuprarenal cytotoxic serum (ACSRCS) specific relative to the adrenal cortex cells was first obtained for dogs. Morphology of the adrenal cortex cell cultures in dogs was studied as directly affected by ACSRCS. Doses of ACSRCS ranging from 2.5 to 20% are established to be inhibitory ones. Specific serum at a dose of 0.1% and lower had a stimulating effect on the cell culture growth. The lowest dose of ACSRCS favouring the growth of the cultures under study was equal to 0.0002%. A direct dependence was found between the degree of the inhibitory effect manifestation and the titre of the cytotoxic sera.

A difference is detected in the stimulating effect on the growth of the dog adrenal cortex cell cultures when applying ACSRCS and ACTH.

Institute of Endocrinology and Metabolism, Kiev;
Department of Immunology and Cytotoxic Sera, the A. A. Bogomolets
Institute of Physiology, Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev