

УДК 615.367

Т. М. Зеленська

МОДЕЛЮВАННЯ ІМУНОПАТОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ В СІМ'ЯНИКАХ ЩУРІВ З ДОПОМОГОЮ ІНГІБУЮЧИХ ДОЗ АНТИТЕСТИКУЛЯРНОЇ ЦИТОТОКСИЧНОЇ СИРОВАТКИ

Відомо, що органі цитотоксичні сироватки застосовують не тільки для лікування різних захворювань [2, 3, 6, 12, 16, 19], але й для відтворення в експерименті імунопатологічних процесів [9, 10, 11, 15, 21].

В основі механізму дії цих сироваток лежить феномен «зворотної анафілаксії», суть якого полягає в тому, що в організм вводять антитіла, які поєднуються з антигенами, в ролі яких виступають відповідні антитілу клітинні елементи, клітини, тканини, органи або системи. В результаті взаємодії антитіла з антигеном відтворюється комплекс антитіло — антиген, якому властива висока біологічна активність, що виражається в здатності викликати гісто (cito)літичну і лейкотоксичну дію [17]. Характер змін, їх ступінь і динаміка розвитку залежать від кількості реагентів (دوزи) і особливостей антитіл [5], однією з яких є їх здатність накопичуватися переважно в тих тканинах, по відношенню до яких одержані сироватки, що містять дані антитіла-цитотоксини [8].

При введенні великої кількості цитотоксинів реакція антитіло — антиген протікає на великих клітинних територіях ефекторних органів, викликаючи альтерацію клітин, на поверхні яких вона розвивається [25]. В результаті цієї реакції звільнюється значна кількість біологічно активних речовин, а саме гістамін — із тучних клітин, серотонін — із тромбоцитів, кініні — з білків сироватки [22], яким відводиться не тільки роль «внутрішніх двигунів» запалення, але з якими ще пов'язаний розвиток судинно-ексудативних і проліферативних реакцій [17].

Викликаючи зміни в органі-ефекторі, медіатори приводять у стан збудження симпато-адреналову і центральну нервову систему, залучаючи тим самим в імунологічний конфлікт весь організм [22].

В утворенні хімічно-активних речовин не остання роль відводиться гідролітичним ферментам лізосом, яких називають «стартовими площадками» запалення [17]. Змінені у вогнищі запалення клітини, в свою чергу, стають антигенами (аутоантигенами) обумовлюючи появу в крові аутоантитіл, спроможних підтримувати аутоімунний процес в організмі [9, 10, 11, 15, 21]. До захворювань, що вивчаються в плані імунопатології, належать аутоалергічний тиреоїдит, нефрит, енцефаломієліт, орхіт тощо.

Нашим завданням було моделювання імунопатологічного процесу в сім'яниках щурів (експериментальний орхіт) з допомогою великих доз антитестикулярної цитотоксичної сироватки, активним діючим началом якої є антитіла (тестикулоцитотоксини). У зв'язку з поставленим завданням нас цікавило, по-перше, які морфологічні зміни відзначаються в органі-ефекторі, де здійснюється імунопатологічний процес. Нами представлені результати вивчення патоморфологічних змін в осередку ушкодження — сім'янику.

Методика досліджень

Досліди проведені на статевозрілих щурах-самцях 5—7 місяців, вагою 180—250 г. Необхідну для досліджень антитестикулярну цитотоксичну сироватку (АТЦС) одержували імунізацією кроликів водно-сольовими екстрактами, виготовленими з тканини сім'яників за розробленою у нашому відділі схемою [21]. Титр антитіла визначали в реакції зв'язування комплементу. В експерименті використовували сироватку з титром тестулоцитотоксинів 1 : 200, 1 : 320.

АТЦС вводили 160 щурам-самцям на протязі п'яти днів внутрішньо з розрахунку по 0,25 мл³ цільної сироватки на 100 г ваги тіла. Тварин декапітували на 3, 10, 21 і 45 добу після закінчення введення АТЦС. Залежно від мети досліджень сім'яники фіксували в 10% нейтральному формаліні, рідині Карнуа і Ліллі. В частині експериментів сім'яники піддавали парафіновій проводці, в інших — зрізи готували на заморожувальному мікромомі. Для електронномікроскопічних досліджень тканини сім'яників щурів наркотизували нембуталом, перфузували судинне русло [29] 2,5% холодним розчином глютаральдегіду, забуферованого фосфатом до рН—7,2; шматочки сім'яних каналців, розміром 2—3 мм витримували в глютаральдегіді до 1 год і промивали 1,5—2 год у фосфатному буфері, потім 1 год фіксували в 1% розчині OSO_4 , обезводнювали у спиртах висхідної міцності, ацетоні і заливали в епон або аралдит. Зрізи, завтовшки 700 А, одержані на ультрамікромомі УМТП-2, контрастували на сіточках цитратом свинцю [30]. Перегляд і фотографування проводили на електронному мікроскопі типу ВС-513А при різних збільшеннях.

У всіх експериментах контролем були сім'яники інтактних тварин.

При дослідженні статевих залоз вивчали їх вагу — абсолютну (в мг) і відносну (в %). На оглядових препаратах, пофарбованих гематоксином та еозином, вимірювали (в мк) діаметр 150 сім'яних каналців і в них висоту шару сперматогенного епітелію. Визначали діаметри 300 сперматогоній типу Б і сперматоцитів з послідовним обчисленням їх об'ємів [23]. Цифровий матеріал обробляли статистично [13]. В зрізах сім'яників з допомогою різних гістохімічних методик виявляли нейтральні ліпіди за [28], α -кетольні групи кетостероїдів — за Канолькаром в модифікації [7], аскорбінову кислоту — за [27], РНК — за Браше, кислу фосфатазу — за Гоморі.

Результати досліджень та їх обговорення

Результати досліджень абсолютної і відносної ваги сім'яників наведені в табл. 1, з якої видно, що вже на третю добу після закінчення введення АТЦС відносна вага сім'яників у 1,4 рази менша, ніж у контролі. Статистично вірогідні зміни відзначаються на 21 і 45 доби, що вказує на зниження функції органа на протязі 1,5 місяців дослідження. Це підтверджено й даними морфометричних змін структур сім'яників (табл. 2). На третю добу після введення АТЦС об'єм родоначальних клітин — сперматогоній в 1,6 раз менший, ніж у контролі. На 10 добу в порівнянні з третьою відзначається деяке збільшення їх об'єму. Цей факт можна пояснити появою нової генерації клітин, які не були безпосередньо під дією сироватки, оскільки продовження циклу сперматогенного епітелію у щу-

Таблиця 1
Середні показники абсолютної та відносної ваги одного сім'яника після введення АТЦС

Статистичні показники	Контроль		Дослід							
	абсолютна вага, мг	відносна вага, мг	абсолютна вага, мг				відносна вага, %			
			доба після введення							
			3	10	1	45	3	10	21	45
n	16	16	10	14	15	31	10	14	15	31
M	1229	0,76	1295	1122	1263	1260	0,54	0,68	0,52	0,59
±m	38,6	0,05	57,46	63,89	40,75	40,89	0,02	0,05	0,02	0,02
p _K			<0,5	<0,2	<0,5	<0,5	<0,001	<0,5	<0,001	<0,01

рів триває 12 діб [24]. На 21 і, особливо, на 45 добу зменшується об'єм сперматогоній, сперматоцитів і діаметр каналців, що, можливо, пов'язано з дією аутоантитіл, які підтримують патологічний процес. Наше припущення про те, що в основі цитотоксичного пошкодження тканин, особливо в пізні строки, лежать аутоімунні процеси, узгоджується з думкою деяких авторів [9, 10, 11, 15, 21], які також моделювали патологічні процеси в різних органах з допомогою цитотоксичних сироваток.

Таблиця 2

Середні показники морфометричних вимірювань структур сім'яників щурів після введення АТЦС (% до показників інтактних щурів, прийнятих за 100 %)

Час дослідження, доби	Об'єм клітин, мк		Висота шару епітелію, мк	Діаметр каналців, мк
	сперматогоній	сперматоцитів		
3	60,82	67,86	93,18	100,38
10	77,48	73,57	97,72	97,32
21	70,08	59,45	90,90	79,77
45	28,28	57,65	111,36	79,77

Одержані нами дані морфометричних вимірювань структур сім'яників підтверджуються гістологічними, гістохімічними та електронно-мікроскопічними дослідженнями.

При мікроскопії препаратів на третю добу після закінчення ін'єкцій АТЦС відзначаються розширені судини, виповнені форменими елементами крові з розташуванням лейкоцитів біля стінки судин. Чіткість рядів клітин сперматогенного епітелію порушена, клітини Сертолі мають лізовану цитоплазму, сперматоцити і сперматиди набрякли. В порожнині каналців відзначаються клітини та безструктурні маси (детрит).

Міжканальцева сполучна тканина набрякла, цитоплазма клітин Лейдига дрібновакуолізована, ядра в частині клітин пікнотичні, в інших — лізовані. Більшість каналців містять краплі ліпідів у цитоплазмі клітин Сертолі і в порожнині каналців. «Ожиріння» клітин Сертолі може бути обумовлене кількома причинами — декомпозицією білково-ліпідних комплексів у цитоплазмі, гальмуванням синтезу та секреції гормона-інгібіна, а також підвищенням фагоцитарної активності фолікулярних клітин [4].

Гістохімічна реакція на кетостероїди в клітинах сперматогенного епітелію, в клітинах Лейдига виявлена слабо, що свідчить про гальмування гормонуутворення. Світлопофарбовані Шиф-позитивні субстанції відзначаються лише в клітинах Сертолі.

Аскорбінова кислота у вигляді аргентофільних субстанцій накопчується в цитоплазмі гормонопродукуючих клітин і клітин гермінативного епітелію, що, ймовірно, пов'язано зі зниженням її витрачання на біосинтез андрогенів, оскільки є дані [14] про участь аскорбінової кислоти в синтезі стероїдних гормонів.

Аналіз гістохімічної реакції на кислу фосфатазу показав різну інтенсивність пофарбування цитоплазми клітин сперматогенного епітелію. Найбільша активність ферменту виявляється в клітинах, розташованих біля артеріол (рис. 1), близько яких також більше клітин, що втягуються в патологічний процес.

Отже, при реакції антиген — антитіло порушується проникність мембранних компонентів клітин у тому числі і мембран лізосом і відзначається вихід гідролітичного ферменту з органел у цитоплазму клітин. На-

ші дані збігаються з дослідженнями [1, 20], одержаними на культурах тканин сім'яників. Електронна мікроскопія виявила зміни у всіх структурах клітин. Хроматин ядер клітин Сертолі конденсований в непра-

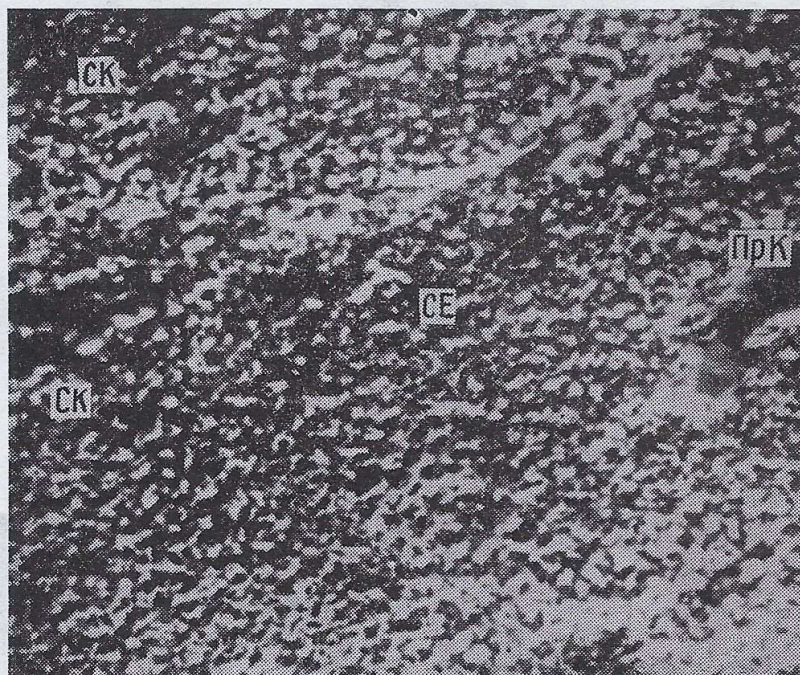


Рис. 1. Сім'яник самця на третю добу після введення АТЦС. Сім'яні каналці (СК) містять клітини сперматогенного епітелію (СЕ) з різною активністю кислої фосфатази, просвіт каналця заповнений білковим субстратом (ПрК), фарбування за Гоморі. Ок. 15. об. 20.

вильні скупчення, крім того виявляється конденсація гранул рибонуклеопротейдів на ядерній мембрані; ядерце компактне, гомогенне; перинуклеарний простір поширений і формує вакуолі у вигляді півмісяця (рис. 2, а, б). Апарат Гольджі характеризується переважанням дрібних вакуолей та сплюсненням каналців (рис. 2, б).

В цитоплазмі сперматид можна бачити мітохондрії з різним станом матрикса — гомогенним, гетерогенним, а також виявляються набряклі мітохондрії з вакуолізованим матриксом та деструкцією крист (рис. 2, б, г); у контролі мітохондрії сперматид мають ясний матрикс з концентричним, подовженим, а також похилим розташуванням крист (рис. 2, в). Після дії сироватки в цитоплазмі сперматид відзначаються структури сферичної форми різного об'єму, що обмежені тонкою, цільною мембраною. Вміст вакуолей малої електронної щільності (рис. 2, д).

Через 10 діб після закінчення введення АТЦС набряк в цілому зменшується. В деяких каналцях сперматоцити в стадії розподілу, в інших є залишки клітин і сім'яний каналець виповнений детритом. Трапляються «гігантські» клітини — багатоядерні сперматиди. Ядра таких клітин ясні, хроматин лізований. Зрілі форми клітин — сперматозоїди в більшості каналців у стані деструкції. Судини виповнені форменими елементами крові. Стінка судин набрякла, ядра гладком'язових клітин бідні на хроматин, набряклі, в цитоплазмі деяких клітин є вакуолі. Відзначається також проліферація клітин сполучної тканини.

Таким чином, на 10 добу поряд із значними явищами дистрофії і деструкції клітин у деяких каналцях можна бачити «оживлення» сперматогенезу, про що свідчать мітози клітин. В порівнянні з третьою добою мітози клітин трапляються частіше, посилюється гістохімічна реак-

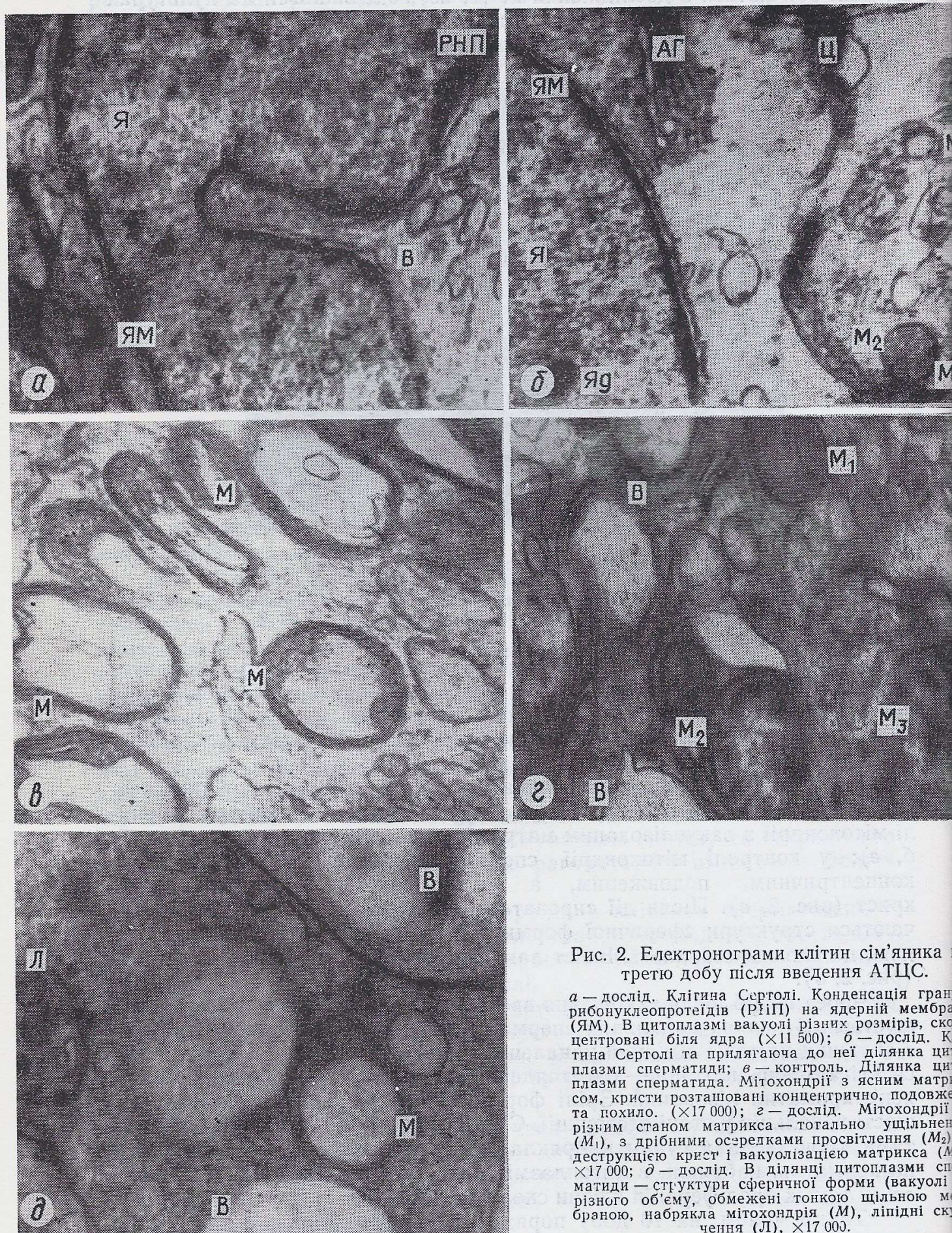


Рис. 2. Електронोगрами клітин сім'яника в третю добу після введення АТЦС.

а — дослід. Клітина Сертолі. Конденсація гранулярного рибонуклеопротейдів (РНП) на ядерній мембрані (ЯМ). В цитоплазмі вакуолі різних розмірів, скопиковані біля ядра ($\times 11\,500$); б — дослід. Клітина Сертолі та прилягаюча до неї ділянка цитоплазми сперматиди; в — контроль. Ділянка цитоплазми сперматиди. Мітохондрії з ясным матриксом, кристи розташовані концентрично, подовжені та похило. ($\times 17\,000$); г — дослід. Мітохондрії різним станом матрикса — тотально ущільнені (M_1), з дрібними осередками просвітлення (M_2), деструкцією крист і вакуолізацією матрикса (M_3) ($\times 17\,000$); д — дослід. В ділянці цитоплазми сперматиди — структури сферичної форми (вакуолі) різного об'єму, обмежені тонкою щільною мембраною, набрякла мітохондрія (М), ліпідні скопичення (Л), $\times 17\,000$.

ція на кетостероїди, в інтерстиціальній тканині визначаються поодинокі гранули ліпідів та Шиф-позитивних субстрацій. Гранули аскорбінової кислоти в значній кількості визначаються під базальною мембраною, в цитоплазмі клітин сперматогоній та сперматоцитів, а також в інтерстиціальній тканині біля судин.

Гістохімічна реакція на кислу фосфатазу в клітинах сперматогенного епітелію окремих каналців добре виражена. Інтенсивно пофарбовані ендотеліальні клітини судин і сполучнотканинні клітини оболонки сім'яників. Активність ферменту в цитоплазмі клітин Лейдига вища, ніж клітин сперматогенного епітелію. Отже, відзначаються всі ознаки дистрофії клітин, що веде до порушення сперматогенезу та гормоноутворення. Крім того, характерна інфільтрація інтерстиціальної тканини лейкоцитами. Розсмоктування загинувших клітин здійснюється повільно і на 21 добу в сім'яниках виявляються каналці, заповнені детритом. Окремі каналці деформовані, оскільки сполучна тканина проліферує в глибину каналців, витискуючи сперматогенний епітелій. В деяких каналцях, незважаючи на проліферацію сполучної тканини, можна бачити фігури поділу клітин на стадії дочірніх зірок. Гістохімічні реакції на ліпіди та кетостероїди виражені слабо. Поодинокі вклучення виявляються під базальною мембраною та в інтерстиції. Активність кислої фосфатази приблизно така ж, як і на десятю добу.

Через 45 діб після закінчення введення сироватки патологічні зміни все ще виявляються як у сперматогенному епітелії, так і в сполучній тканині. Сполучнотканинні прошарки поширені, як за рахунок волокнистих структур, так і внаслідок проліферації клітин. Вміст ліпідів у клітинах сперматогенного епітелію, в інтерстиціальній тканині та в клітинах Сертолі незначний. Відзначається тільки посилення гістохімічної реакції на кетостероїди в клітинах Сертолі. Активність кислої фосфатази на 45 добу найбільша в порівнянні з усіма строками дослідження. Таким чином, на 45 добу за рядом показників морфо-функціональний стан сім'яників погіршується, що, мабуть, пов'язано з дією аутоантитіл, яким властива агресивність та які підтримують патологічний процес в органі. На основі наведених даних можна прийти до висновку про те, що великі дози АТЦС, активним діючим началом якої є антитіла (тестикулоцитотоксини), викликають у сім'яниках — органі-ефекторі патологічний процес, який характеризується сполученням альтерації клітин з вираженою судинною реакцією, що приводить до розвитку імунного (алергічного) запалення, яке втягує в процес сім'яні каналці та інтерстицій, тим самим порушуючи як сперматогенну, так і гормоноутворювальну функцію органа. Результати досліджень свідчать про те, що з допомогою великих доз АТЦС можна моделювати патологічний процес у сім'яниках (експериментальний орхіт).

Одержана модель може бути використана для з'ясування ролі антитіл у розвитку різних захворювань імунної природи взагалі та вивчення патогенезу орхіту, зокрема.

Л і т е р а т у р а

1. Барченко Л. И. Распределение кислой фосфатазы в клетках культур тканей семенника яичника после воздействия разных доз антитестикулярной и антиовариальной цитотоксической сывороток.— В сб.: Цитотоксины в соврем. мед., 1972, 6, 66—71.
2. Богомолец А. А. О стимулирующем действии антиретикулярной цитотоксической сыворотки на физиологическую систему соединительной ткани.— Мед. журн., 1939, IX, 792—796.
3. Богомолец О. А. К механизму действия АЦС.— В кн.: Цитотоксины в соврем. мед., Изд. «Здоров'я», К., 1960, 2, 103.

4. Васильев Г. А., Медведев Ю. А., Хмельницкий О. К. Эндокринная система при кислородном голодании, Л., «Наука», 1974.
5. Вершигора А. Е. Основы иммунологии, К., «Вища школа», 1976.
6. Гоноровский А. Г. Влияние иммунной антиовариальной цитотоксической сыворотки на функциональное состояние яичников женщин при некоторых формах их недостаточности.— Автореф. дис., К., 1973.
7. Зак К. Н., Науменко Н. И. Методика окраски надпочечников шифф-хлорным железом.— Пробл. эндокринол., 1969, XV, 1, 66—70.
8. Зеленская Т. М. Влияние антиовариальной и антиэстимуляторной цитотоксических сывороток на функциональное состояние и морфологические структуры яичников и семенников крыс в возрастном аспекте.— Автореф. дис., К., 1967.
9. Кишев М. Г. Иммунологическое повреждение сосудистой стенки.— В сб.: Тез. докл. II конф. по иммунопатол., Л., 1966, 25.
10. Левин Г. С. Иммунология поражений печени. Ташкент, «Медгиз», 1972.
11. Левкова Н. А. Роль органоантител в локализации патологического процесса, К., «Здоров'я», 1967.
12. Нищенко О. В. Влияние иммунной антиэстимуляторной цитотоксической сыворотки на мужские половые железы при нарушении их гормональной функции.— Автореф. дис., К., 1969.
13. Ойвин И. А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований.— Патол. физиол. и exper. терапия, 1960, 4, 76.
14. Роскин Г. И. Витамин С в жизни клеток в норме и патологии.— Успехи совр. биол., 1944, 18, 2, 194—213.
15. Сагач В. Ф. Моделирование и гемодинамическая характеристика дистрофических повреждений миокарда. Автореф. дис., К., 1974.
16. Сахаров Г. П., Российский Д. М. Наблюдения над применением панкреатоксина при сахарном диабете.— Клиническая медицина, 1937, 15, 2.
17. Серов В. В., Пауков В. С. Ультраструктурная патология, М., «Медицина», 1975.
18. Спасокукоцкий Ю. О. Функціональні зміни організму під впливом застосування антиоваріальної та антиестимуляторної цитотоксичних сироваток у віковому розрізі.— Фізіол. журн. АН УРСР, 1964, 10, 6, 710.
19. Спасокукоцкий Ю. А. О действии антиовариальной и антиэстимуляторной цитотоксических сывороток.— В сб.: Цитотоксины в соврем. мед., К., «Здоров'я», 1967, IV, 97—102.
20. Спасокукоцкий Ю. О., Барченко Л. И., Майский В. О. Реакция внутриклеточных структур эксплантатов сём'яника на дію антиэстимуляторной цитотоксичної сироватки.— Фізіол. журн. АН УРСР, 1974, XX, 1, 44—53.
21. Супоницкая Ф. М. О патогенетическом значении цитотоксинов в процессах неинфекционной иммунопатологии.— В сб.: Тез. докл. II конф. по иммунопатологии, Л., 1966, 10—11.
22. Фролов Е. П. Нейро-гуморальные механизмы регуляции иммунологических процессов, М., «Медицина», 1975.
23. Хесин Я. Е. Размеры ядер и функциональное состояние клеток, М., «Медицина», 1967.
24. Clermont Y., Leblond C. P., Messier B. (Цит. за Райциною. Травма семенника и аутоиммунитет. М., «Медицина», 1970).
25. Dourmashkin R. How antibody attacks cells.— New Scientist, 1964, 23, 81—82.
26. (Gerbert U. J.) Герберт У. Дж. Ветеринарная иммунология. М., «Колос», 1974.
27. Giroud A., Leblond C. P. Histological study of renal elimination of ascorbic acid.— Anat. Rec., 1937, 68, 113—126.
28. Kay W. W., Whitehead R. The Role of impurities and mixtures of isomers in the staining of rat by commercial sudans.— J. Path. Bact., 1941, 53, 279—284.
29. Koenig H., Groat R. A., Windle W. F. A physiological approach to perfusion-fixates of tissues with formalin.— Stain Technology, A. J. for Microtechnic, 1945, 20, 1, 13—22.
30. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high PH as an electron opaque stain in electron microscopy.— J. Cell Biol., 1963, 17, 208—212.

Відділ імунології та цитотоксичних сироваток
Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця
АН УРСР, Київ

Надійшла до редакції
16.IV 1976 р.

T. M. ZELENSKAJA

MODELLING OF IMMUNOPATHOLOGICAL PROCESS
IN RAT TESTICLES BY MEANS OF INHIBITORY DOSES
OF ANTITESTICULAR CYTOTOXIC SERUM

Summary

Experiments with 160 puberal male rats showed the possibility to obtain the model of experimental orchitis by the intravenous injection of antitesticular cytotoxic serum (ATCS) in inhibitory doses; the antibodies — testiculocytotoxins being the effective agents of the serum. Pathomorphological changes in the effector organ were studied by means of light and electron microscopy.

Department of Immunology and Cytotoxic Sera,
the A. A. Bogomoletz Institute of Physiology, Academy of Sciences,
Ukrainian SSR, Kiev