

УДК 612.017.6.15.361

Н. В. Ильчевич, Т. М. Зеленская, О. В. Нищименко

ДЕЙСТВИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G И M, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТЕСТИКУЛЯРНОЙ АНТИСЫВОРОТКИ, НА СЕМЕННИКИ ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС

Разделение белков сыворотки крови на фракции и установление связи наименее подвижной из них γ -глобулина — с антителами имеет большое теоретическое и практическое значение. Логическим продолжением таких исследований явилось фракционирование белков сыворотки крови для выделения наиболее активных иммуноглобулинов.

Ранее нами изучались антителикулярные цитотоксические сыворотки (АТЦС), специфичные к половым железам животных и человека [2, 3, 6, 11]. Для повышения специфического направленного действия тестикулярной антисыворотки, а также освобождения ее от балластных белков из нее были выделены γ -глобулиновая фракция, а также иммуноглобулины класса G и M [1, 5]. Показано, что иммуноглобулины класса G и M при изучении *in vitro* обладают разной иммунологической активностью. Было установлено, что комплементсвязывающая и цитотоксическая активность АТЦС обусловлена преимущественно фракцией G. Фракция M оказалась менее активной и специфичной.

В свете полученных данных представляет интерес изучение биологического действия G и M фракций иммуноглобулинов *in vivo*. Мы исследовали морфо-функциональное состояние семенников половозрелых крыс после воздействия IgG и IgM.

Методика исследований

АТЦС получали иммунизацией кроликов водно-солевыми экстрактами, приготовленными из паренхимы семенников крыс. Тестикулярный антиген (10%) вводили животным внутривенно и внутрибрюшинно четырехкратно с интервалом в три дня. Титр антител определяли в реакции связывания комплемента на девятый день после введения антигена. Титр изучаемых сывороток составлял 1:320 и 1:400.

Из АТЦС методом гель-фильтрации на сефадексе Ж-200 по [13] выделяли иммуноглобулины класса M и G. Гель-фильтрацию проводили на колонке (2,6×7,5 см), заполненной сефадексом. Элюцию осуществляли с помощью 0,02 M раствора трис-буфера (pH — 8,0) с 0,2 M раствором NaCl. Отбор фракций (по 4 мл) проводили на механическом коллекторе. Спектральную характеристику фракций изучали на спектрофотометре СФ-4А при поглощении в ультрафиолетовой части спектра на волне 280 мкм. Количество белка во фракции определяли по [15]. Идентификацию иммуноглобулинов класса G и M осуществляли методом аналитического диск-электрофореза в полиакриламидном геле по [12, 16]. Электрофорез проводили на аппарате «Реанал» — модель 69.

G и M фракции иммуноглобулинов после диализа против изотонического раствора хлорида натрия вводили пятикратно (ежедневно) в хвостовую вену из расчета по 0,005 мл/0,5 мг белка на 100 г на одну инъекцию. Большая доза выбрана для получения наиболее выраженного эффекта.

Исследования проведены на 52 крысах-самцах в возрасте 5—7 мес линии Вистар. На 3, 10, 21 сут после окончания введения фракций животных декапитировали и семенники брали для гистологических исследований. Органы фиксировали в 10% нейтральном формалине, проводили в спиртах восходящей крепости, парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. На препаратах окуляр-микро-

метром с подвижной шкалой измеряли диаметр семенных канальцев, ширину межканальцевой соединительной ткани, количество клеток Лейдига и диаметр их ядер. Подсчитывали количество канальцев (в %), содержащих определенные клеточные ассоциации, исходя из классификации [17]. Для электронной микроскопии брали кусочки семенных канальцев, для чего крысы наркотизировали нембуталом, перфузировали сосудистое русло [14] 2,5% холодным раствором глutarальдегида с последующей фиксацией в 1% растворе OsO_4 , обезживали в спиртах восходящей крепости, ацетоне и заливали в аралдит. Срезы толщиной 500 Å, полученные на LKB, контрастировали цитратом свинца [18]. Просмотр и фотографирование проводили на электронном микроскопе типа BC-513 А. Во всех экспериментах контролем служили семенники intactных животных. Цифровые данные обрабатывали статистически [7].

Результаты исследований

На третьи сутки после пятикратного введения *IgG* в большинстве семенных канальцев отмечается отслоение клеток сперматогенного эпителия от базальной мембраны. Клетки Сертоли в одних канальцах с плотной гомогенной цитоплазмой, в других — светлой, прозрачной. Преобладают семенные канальцы (68%) на I—VIII стадиях сперматогенеза, характеризующиеся наличием четырех ассоциаций клеток: сперматогоний типа А и В, сперматоцитов I порядка, молодых сперматид в фазах Гольджи и колпачка, а также спермиев в 15—19 стадиях. Однако клетки сперматогенного эпителия изменены: сперматогонии типа А с плотной эозинофильной цитоплазмой и едва определяемым ядрышком. В некоторых канальцах видны единичные сперматогонии типа В со светлым ядром, по которому рассыпаны гранулы хроматина, и прилежащим к ядерной мембране крупным ядрышком. Сперматоциты I порядка на всех стадиях трансформации характеризуются темной эозинофильной цитоплазмой и пикнотичным ядром, сперматиды — лизированными контурами цитоплазмы.

Под капсулой семенника выявляются участки опустошенных семенных канальцев, в которых определяются лишь обрывки сперматогенного эпителия (рис. 1, а). Средний диаметр семенных канальцев снижен по сравнению с intactными животными за счет расширенных межканальцевых соединительнотканых прослоек, в которых определяются клетки Лейдига с крупными ядрами (рис. 2, А, Б).

Наряду с этим встречаются семенные канальцы, в которых сперматоциты I порядка на различных стадиях деления: метафазы, анафазы, что, видимо, обусловлено высокой регенерационной способностью клеток сперматогенного эпителия. Микроциркуляторное русло полнокровно, сосуды выполнены форменными элементами крови, характерно пристеночное расположение лейкоцитов и выход их за пределы сосудистого русла, что свидетельствует о повышенной проницаемости сосудистой стенки. В межканальцевой соединительной ткани и в капсуле семенника вблизи сосуда выявляются клетки с ядром бобовидной формы — гистиоциты.

При исследовании семенных канальцев на уровне ультраструктур видны изменения в органеллах клеток. В частности, митохондрии клеток Сертоли характеризуются очаговым просветлением матрикса, расплывчатыми контурами крист, что свидетельствует об их набухании. Эндоплазматическая сеть представлена крупными деформированными вакуолями и мелкими пузырьками, разделенными прослойками микросреды (рис. 3, а). В клетках Лейдига видны митохондрии разных размеров с очагами просветления матрикса и отсутствием крист, кроме того в цитоплазме клеток определяются бесструктурные тяжи, представляющие собой фиксированные иммунные комплексы, видимые на электронограммах в виде депозитов (рис. 4).

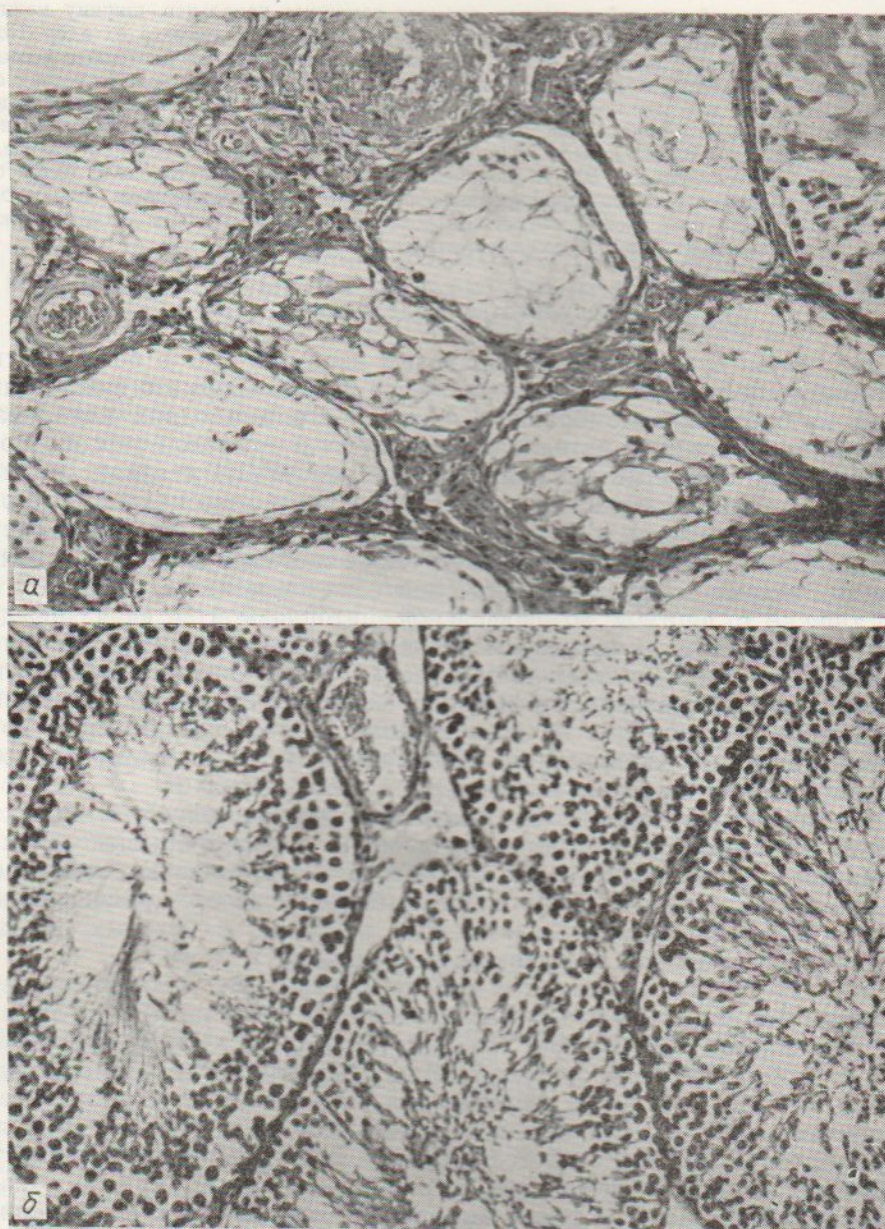


Рис. 1. Семенники крыс на третьи сутки после введения *IgG* (а) и *IgM* (б).
а — опустошенные семенные канальцы, измененные стенки сосудов; б — сперматогенный эпителий на разных этапах дифференциации, умеренное полнокровие сосудов. Гематоксилин-эозин, $\times 320$.

На десятые сутки семенные канальцы на I—VIII стадиях цикла сперматогенного эпителия составляют примерно (как и на третьи сутки) 70%. Отек ткани несколько уменьшен, диаметр семенных канальцев не отличается от наблюдаемого у интактных животных. Однако в большинстве семенных канальцев наряду с нормальными клетками выявляются дистрофически измененные клетки с эозинофильной

плотной цитоплазмой и пикнотичным ядром. Микроциркуляторное русло полнокровно, количество клеток Лейдига значительно увеличено (177,4%), диаметр ядер клеток такой же, как и на третьей сутки.

Электронномикроскопически в некоторых клетках Сертоли выявлены своеобразные структуры сферической формы с фестончатыми краями (рис. 3, б), ограниченные мембраной. Наличие таких фигур, по мнению Поликар и Бесси [8], связано с неконтролируемым поглощением клетками воды, и их образование характеризует патологическое

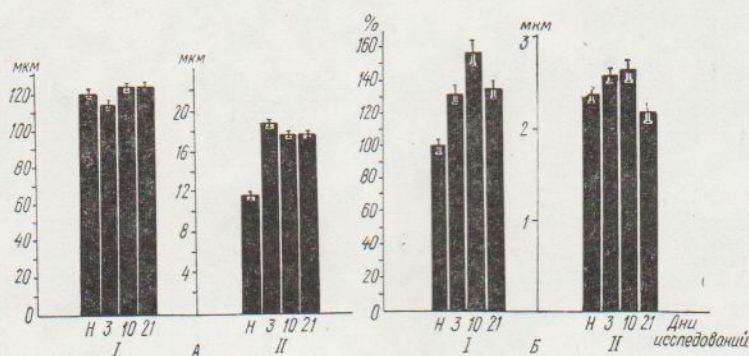


Рис. 2. Морфо- и цитометрические показатели структур семенников после введения больших доз IgG.

А — диаметр семенных канальцев (I), ширина межканальцевых прослоек (II). Б — количество клеток Лейдига (I), диаметр клеток Лейдига (II).

состояние клетки. В содержимом этих структур выявляются гранулы и светлые полости. Поликар и Бесси считают, что в основе этого явления лежит реакция действующего агента с сульфгидрильными группами белков, ведущая к трем процессам: нарушению проницаемости (с усиленным поглощением воды), уменьшению нормальной способности утилизировать воду и соли и, наконец, к повреждению клеточной поверхности. Блокада сульфгидрильных групп белков влечет за собой значительное подавление клеточного метаболизма и приводит к гибели клетки.

На 21 сут после введения IgG количество канальцев на I—VIII стадиях цикла сперматогенного эпителия составляет 76,5%, что указывает на активное деление клеток и усиление сперматогенеза. В одних канальцах сперматогонии типа А и В мелкие, в других — гипертрофированы, сперматоциты в одних — в стадии роста, в других — дистрофичны. Видны участки нарушения целостности базальной мембраны и проникновения межканальцевой соединительной ткани в канальцы. Под соединительнотканной капсулой выявляются инфильтраты, состоящие из нейтрофилов и гистиоцитов, а также определяются отдельные лимфоидные клетки. Часть мелких сосудов, облитерирована. Диаметр семенных канальцев соответствует примерно наблюдаемому у интактных животных. Количество клеток Лейдига и их диаметр уменьшены по сравнению с десяти сутками исследования, но по сравнению с интактными животными — достоверно выше. Таким образом, наряду с деструктивными процессами имеют место и репаративные.

На третьи сутки после введения IgM сосуды умеренно полнокровны. Наряду с уменьшением количества семенных канальцев на IX—XIV стадиях сперматогенеза увеличивается количество канальцев в периоде роста и созревания (81%) (рис. 1, б). Определяются единичные семенные канальцы с дискомплексированными клетками эпителия. Ши-

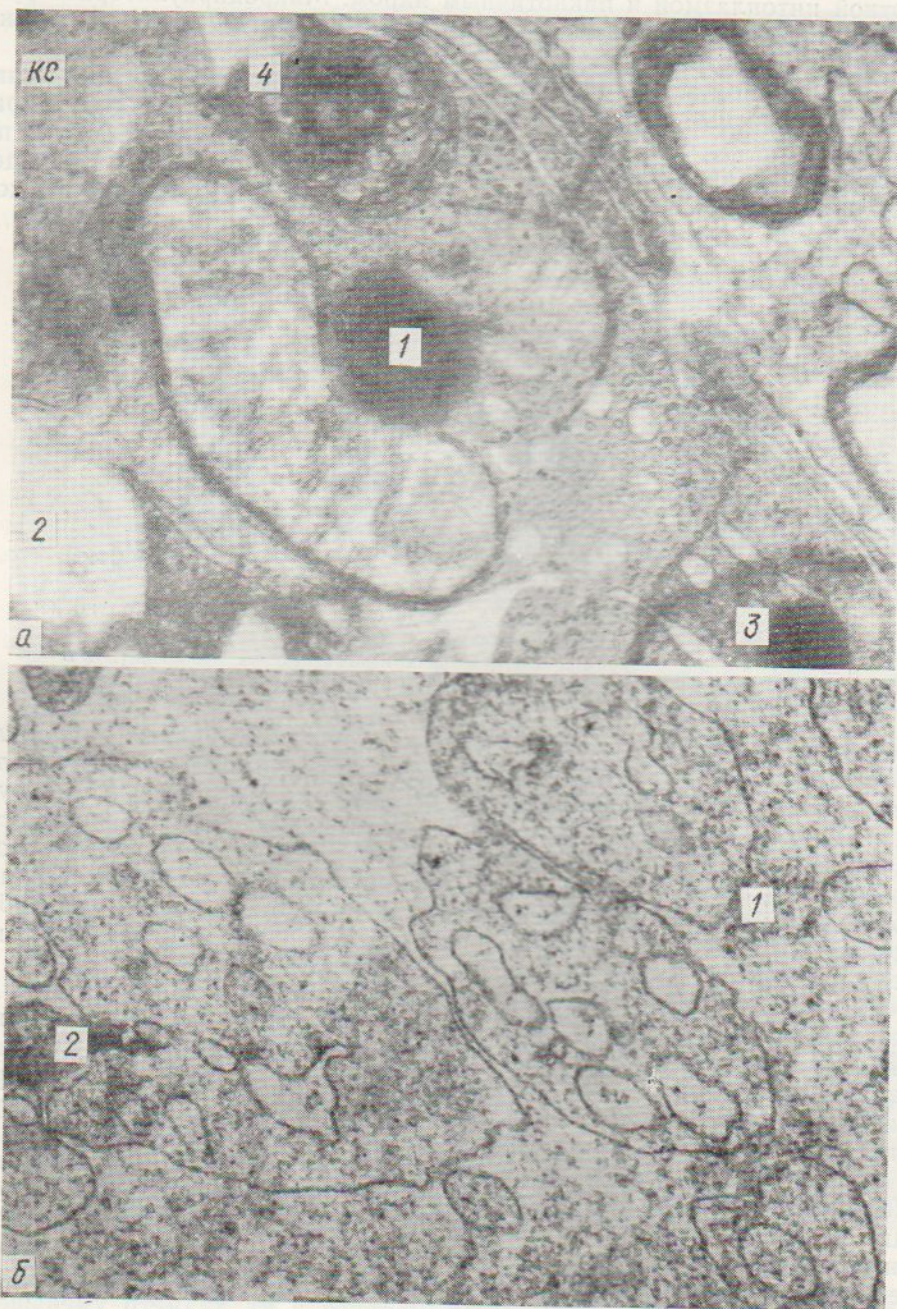


Рис. 3. Фрагменты цитоплазмы клеток Сертоли (КС) на третьи (а) и десятые (б) сутки после введения IgG.
 а — митохондрия с деструкцией крист и очаговым просветлением матрикса (1), эндоплазматический ретикулум в виде крупных (2) и мелких (3) вакуолей, аутофагосома (4); б — на цитоплазматической поверхности клетки видны структуры овальной и причудливой формы (2). Электронограмма, $\times 22\,500$.



Рис. 4. Фрагмент цитоплазмы клетки Лейдига на третьи сутки после введения *IgG*. Бесструктурные тяжи в цитоплазме клетки — место фиксации иммунного комплекса-депозит (Д). Электронограмма, $\times 22\,880$.

рина межканальцевой соединительной ткани не изменена, но в ней выявляются единичные гистиоцитарные и лейкоцитарные клетки, которые видны также и под соединительнотканной капсулой. Размер ядер клеток Лейдига примерно такой же как и у интактных животных.

На десятые сутки слой герминативных клеток широкий, но клетки во многих канальцах дистрофически изменены. Наряду с этим определяются сперматоциты на различных этапах деления. Количество клеток

Лейдига уменьшено, но ядра клеток более крупных размеров ($2,33 \pm 0,12$ мкм — в контроле, $2,7 \pm 0,06$ мкм в опыте).

Через три недели сосуды умеренно полнокровны, в преобладающем большинстве канальцев выявляются клетки эпителия в периоде роста и созревания, о чем свидетельствуют гипертрофированные сперматогонии, сперматоциты на различных стадиях митоза. Диаметры ядер клеток Лейдига примерно такие же как и у интактных животных.

Таким образом, при анализе полученных данных выявляются некоторые отличия в действии G и M-фракций иммуноглобулинов на морфо-функциональное состояние семенников.

При действии IgG статистически достоверно увеличивается ширина межканальцевой соединительной ткани и количество клеток Лейдига, что не отмечено при действии IgM. Наблюдаемое увеличение количества клеток Лейдига, вероятно, связано с нарушением корреляции эндокринных желез. В данном случае можно говорить о гормональной или коррелятивной гипертрофии, являющейся реакцией на гипоплазию вплоть до аплазии сперматогенного эпителия в отдельных канальцах. Описанные изменения можно трактовать как компенсаторно-приспособительный процесс.

При действии больших доз IgG выявляются изменения стенки сосудов. Согласно данным литературы [4], к предполагаемым механизмам повышения сосудистой проницаемости при взаимодействии комплекса антиген-антитело относятся высвобождение гистамина и серотонина, образование биологически активных фрагментов из комплекса, активация специфического фактора проницаемости плазмы и выделение субстанций из полиморфно-ядерных лейкоцитов. IgG обладает способностью проходить через стенки капилляров [4], следовательно, это облегчает их прохождение через гемато-тестикулярный барьер, одним из структурных компонентов которого является сосудистая стенка [9, 10]. IgM не обладает способностью проникать через стенки капилляров [4] чем, видимо, и обусловлен незначительный ингибирующий эффект больших доз этой фракции.

В результате проведенных исследований можно прийти к заключению о том, что большие дозы IgG оказывают более выраженный эффект на семенники половозрелых животных, что имеет важное теоретическое и практическое значение, в частности для использования больших доз IgG в качестве инструмента для моделирования патологического процесса в семенниках с целью изучения патогенеза, часто встречающегося в клинике аутоиммунного орхита. Кроме того, выяснение вопроса о том, за счет какой фракции иммуноглобулинов вызывается специфический эффект действия тестикулярной антисыворотки на семенники важно с точки зрения повышения ее направленного действия.

Литература

1. Ильевич Н. В., Нищименко О. В. Изучение активности M и G антител антителикулярной цитотоксической сыворотки в серологических и цитотоксических реакциях. — Доклады АН УССР, 1975, № 10, с. 932—935.
2. Ильевич Н. В., Барченко Л. И., Нищименко О. В., Зеленская Т. М., Гоноровский А. Г., Михайленко Е. Т. Изучение действия антителикулярной и антиовариальной цитотоксической сыворотки на половые железы животных и человека. — Проблемы патологии в эксперименте и клинике. Сб. научных трудов. Львов, 1979, т. III, с. 63—65.
3. Зеленская Т. М. Влияние антиовариальной и антителикулярной цитотоксических сывороток на функциональное состояние и морфологические структуры яичников и семенников крыс в возрастном разрезе: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — К., 1967. — 20 с.

4. Мовзт Г. Острое воспаление.— В кн.: Воспаление, иммунитет и гиперчувствительность. М.: Медицина, 1975.—560.
5. Нищименко О. В. Характеристика імунологічної активності і специфічності різних класів (М, G) імуноглобулінів антитестикулярної цитотоксичної сироватки.— Фізіол. ж. АН УРСР, 1974, 20, № 5, с. 586—589.
6. Нищименко С. В. Влияние иммунной антитестикулярной цитотоксической сыворотки на половые железы при нарушении их гормональной функции: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— К., 1969.—22 с.
7. Ойвин И. А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований.— Патол. физиол. и эксперим. терапия, 1960, № 4, с. 76—85.
8. Поликар А., Бесси М. Элементы патологии клетки.— М.: Мир, 1970.—348 с.
9. Райцина С. С. Травма семенника и аутоиммунитет.— М.: Медицина, 1970.—182 с.
10. Райцина С. С., Н. С. Гладкова, А. И. Давыдова. Гемато-тестикулярный барьер, ультраструктура его основных компонентов, проницаемость и роль в организации и регуляции сперматогенеза.— В кн.: Тезисы докладов V совещания по проблеме «Гисто-гематические барьеры», посвященного 100-летию со дня рождения академика Л. С. Штерн (20—23 ноября 1978). М., 1978, с. 80.
11. Спасокукоцкий Ю. А., Ильевич Н. В., Барченко Л. И., Нищименко О. В., Зеленская Т. М., Гоноровский А. Г. Действие специфических цитотоксических сывороток на половые железы. К., Наукова думка, 1977,—216 с.
12. Davis B. J. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1974, 121, p. 404—406.
13. Flodin P., Killander J. Fractionation of human serum proteins by gelfiltration.— Biochem. acta, 1962 63, p. 403—410.
14. Koenig H., Groat R. A., Windle W. F. A physiological approach to perfusion-fixates of tissues with formalin.— Stain Technology, 1945, 20, N 1, p. 13—22.
15. Lowry O. H. Rosenbrough N. J., Farr A. L., Kandall R. J. Protein measurement with the follin phenol reagent.— J. Biol. Chem., 1951, 193, N 1, p. 265—275.
16. Ornstein L. Disc electrophoresis I. Background and theory.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, 121, p. 321—328.
17. Perey P., Clermont Y., Leblond P. The wave of the seminiferous epithelium in the rat.— Amer. Anat., 1961, 108, N 1, p. 47—77.
18. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high PH as an electron opaque stain in electron microscopy.— J. Cell. Biol., 1963, 17, p. 208—218.

Отдел иммунологии и цитотоксических
сывороток Института физиологии
им. А. А. Богомольца АН УССР, Киев

Поступила в редакцию
28. VI 1979 г.

N. V. Ilchevich, T. M. Zelenskaya, O. V. Nishchimenko

THE ACTION OF G AND M IMMUNOGLOBULINS ISOLATED FROM TESTICULAR ANTISERUM ON THE RUBERAL RAT TESTICLES

Summary

The effect of large doses of IgG and IgM, isolated from testicular antiserum specific to the rat testicles, was studied in ruberal male rates, aged 5-7 months. Light and electron microscopy, morpho- and cytometric investigations detected changes in the testicles under the effect of various fractions. Large doses of IgG are shown to produce a more pronounced biological effect.

The results of the research make it possible to explain which fraction of immunoglobulins causes a precise effect of the antitesticular cytotoxic serum action and to use Ig G large doses as a tool affecting the testicles for modelling the pathological process in the experiment for studying pathogenesis of frequent anticomune orchitis, which is of theoretical and practical significance.

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