

П 311  
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР  
ОТДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

На правах рукописи

Роза Андраниковна ПЕТРОСЯН

ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО  
АНТИГЕНА И РЕНТГЕНОВЫХ ЛУЧЕЙ НА ПОГЛОТИТЕЛЬНУЮ И  
АНТИТЕЛООБРАЗОВАТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИИ РЭС БЕЛЫХ КРЫС

(03.00.13 - физиология человека и животных)

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

ЕРЕВАН - 1976

Диссертация выполнена в Институте зоологии АН Арм.ССР  
(директор - доктор биологических наук, профессор С.М.САРКИСЯН)

Научный руководитель-доктор биологических наук,  
Э.Д.СТЕПАНЯН

Официальные оппоненты:

Заслуженный деятель науки Армянской ССР, доктор биологических наук, профессор С.Ш.САКАНЯН

Доктор медицинских наук Э.Е.ОГАНДЖАНЯН

Ведущее учреждение - кафедра физиологии человека и животных Ереванского государственного университета.

Автореферат разослан "26" января 1976 г.

Защита диссертации состоится на заседании Учёного Совета по физиологии человека и животных, биохимии и физиологически активным веществам при Отделении биологических наук АН Армянской ССР "27" февраля 1976 года в 14 часов.

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу:  
Ереван 375028, ул. братьев Орбели 22. Институт физиологии имени акад. Л.А.ОРБЕЛИ АН Арм.ССР, Учёному секретарю.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Отделения биологических наук АН Арм.ССР.

Ученый секретарь совета КАЗАРЯН К.В.

## ВВЕДЕНИЕ

Согласно рефлекторной теории И.П.Павлова (1949) болезнетворные агенты, с одной стороны, вызывают в организме патологические явления, а с другой - специфически возбуждают его защитно-физиологические приспособления, предназначенные для восстановления нормы.

Из множества защитных приспособлений организма важное место отводится ретикуло-эндотелиальной системе (РЭС). Будучи исполнительной системой, РЭС выступает в организме своеобразной биологической "лабораторией иммуногенеза" (Н.Ф.Гамалея, 1928) и от нее во многом зависит "состояние здоровья и болезни организма" (А.А.Богомолец, 1929). Ярким примером сказанного является ведущая роль РЭС в иммунитете и радиорезистентности организма (В.А.Троицкий, М.А.Туманян, 1958; В.П.Теодорович, 1961; Р.В.Петров, 1962; Н.Н.Клемпарская и соав., 1963; *Petersen*, 1960 и др.).

Начиная с классических исследований И.И.Мечникова (1883) и по сей день РЭС неизменно служила объектом пристального внимания многих ученых смежных дисциплин. К настоящему времени интерес к ее изучению еще более возрос в связи с подробными исследованиями цитологии иммуногенеза (М.П.Покровская и соав., 1963; Р.В.Петров, 1970; П.А.Вершилова и М.И.Чернышева, 1970; *Fagraeus*, 1958).

Достижения в области цитоиммунологии подтвердили правомерность фагоцитарной теории Мечникова и подкрепили ее новыми фактами и представлениями. В частности, выяснилось, что специфические антитела преимущественно вырабатываются плазмочитами и клетками лимфоидной ткани при активном участии элементов РЭС (А.А.Богомолец, 1941; М.П.Покровская и соав., 1964; Л.Н.Фонталин, 1967; Ф.Гауровиц, 1969; Р.В.Петров и соав., 1971; *Talbot*, 1969).

В то же время цитоиммунологические наблюдения расширили наше представление о физиологии клетки и значении митотического деления ее в генетическом самовоспроизведении. И поскольку митоз клеток через нервно-гуморальные механизмы регуляции оказался в тесной зависимости от общего состояния организма, им стали



успешно пользоваться в качестве чувствительного и объективного морфологического показателя здоровья и болезни (С.Я.Залкинд, И.А.Уткин, 1951; И.А.Алов, 1972 и др.).

Несмотря на значительные успехи, достигнутые при раздельном изучении защитных свойств РЭС и митотического деления клеток, вопрос о характере их совместных изменений при воздействии различных патогенных агентов на организм остается еще полностью не разрешенным. Знание же особенностей их совместных проявлений в норме и патологии послужило бы научным основанием для рационального управления защитными и пролиферативными свойствами организма путем преимущественного воздействия на иммунобиологические функции РЭС и митотическое деление клеток.

## СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Материал и методика

Исследования проводились на крысах линии Вистар, обоого пола, примерно одинакового возраста и веса (150-200 г).

Из множества существующих функциональных способов изучения поглотительной способности РЭС мы остановились на конгорот-пробе, предложенной Адлером и Рейманом (*Adler u. Reiman*, 1925) в модификациях С.Ш.Саканяна (1949) и Э.Д.Степаняна (1963, 1969). Этому способствовали многочисленные положительные отзывы видных специалистов, признающих конгорот-пробу наиболее физиологичным, простым, чувствительным и объективным методом изучения поглотительной деятельности РЭС людей и животных (А.А.Богомолец, 1927; Н.М.Николаев и Д.Д.Тихомиров, 1927; Н.Н.Аничков, 1937; Р.Е.Кавецкий, 1941; Н.Н.Сиротинин, 1949; Г.Ф.Дядюша, 1961; *Макайата*, 1959; *Kosaka*, 1963).

Сущность постановки и учета конгорот-пробы в принятом нами варианте заключалась в том, что крысе внутривенно инъецировалось 0,2% конгорот на физиологическом растворе в дозе 0,4 мл/100 г. Затем, спустя 4 и 30 мин., пункцией сердца получали по 0,2 - 0,3 мл. соответственно две порции крови. После отстаивания и центрифугирования из окрашенных сывороток крови забиралось по 0,1 мл и переносилось в пробирки, содержащие по 1 мл 0,45N раствора соляной кислоты. При этом окрашенная в конго красный цвет

сыворотка тут же без выпадения белков переходила в конго синий. Таким образом, предотвращалась возможность имитации цвета конгорот при колориметрировании проб крови с наличием в них следов гемолиза. Стойко окрашенные в конго синий цвет растворы сывороток переливались в 3-х мм кюветы и при красном светофильтре колориметрировались на ФЭК-Н-57.

На основании полученных величин экстинзии вычислялся конгорот-индекс. Он выражал процентное отношение концентрации красителя в сыворотке крови второй (30-и мин.) к первой (4-х мин.) порции, принимаемой за 100%. Величина индекса прямо пропорциональна конгорот в крови и обратно пропорциональна степени активности поглотительной способности элементов РЭС. Иначе говоря, низкий индекс указывал на стимуляцию, а высокий - угнетение поглощения.

Участие РЭС в образовании специфических антител изучалось у предварительно иммунизированных убитой бруцеллезной культурой (*Br. bovis*) штамма № 19 белых крыс. Животным инъецировалось внутривенно по 0,2-0,3 мл вакцинного материала, содержащего 10 млрд. бактериальных тел в 1 мл физиологического раствора. В сыворотке крови обработанных животных реакцией агглютинации (РА) определялся предельный титр специфических антител.

Общепринятыми цитологическими методами у декапитированных подопытных и контрольных крыс изучались митотическая активность и хромосомные нарушения клеток селезенки и костного мозга бедра. Испытуемые ткани фиксировались в смеси спирт-уксусная кислота (3:1) при температуре 4°C и окрашивались ацетоорсеином или ацетокармином. Митотическая активность выражалась в процентных отношениях числа делящихся клеток к общему количеству подсчитанных клеток (7-10 тыс.). Среди регистрированных 100-150 клеток, находящихся на стадиях поздней анафазы и ранней телофазы, определялось в процентах число клеток с хромосомными aberrациями (мосты, ацентрические фрагменты, мосты с фрагментами).

Для более детального цитологического анализа в препаратах выборочно определялся характер смещения "ранних" (профаза+метафаза) и "поздних" (анафаза+телофаза) стадий митоза, а также его коэффициент (К)  $\frac{П+М}{А+Т}$  (С.Я.Залкинд, 1951; А и Л.Гурвич, 1945; С.Я.Залкинд и И.Д.Уткин, 1951; И.А.Алов, 1955 и др.).



Крысы облучались тотально на рентгенотерапевтической установке РУМ-II при условиях: напряжение - 187 кв, сила тока - 15мА, фильтры - 0,5 мм меди и 1,0 мм алюминия, кожно-фокусное расстояние - 45 см, мощность дозы 24,5 р/мин. Животные облучались по 4-8 голов во вращающейся (1-2 об/мин.) камере. Во избежание вторичного излучения под камеру помещалась просвинцованная резиновая прокладка.

Критериями радиочувствительности служили средняя продолжительность жизни облученных крыс и процент выживаемости, определяемые в течение 30-и дневного наблюдения.

Цифровой материал обрабатывался статистически с вычислением средней арифметической величины ( $M$ ), средней квадратической ошибки ( $\pm$ )<sup>m</sup> и степени достоверности различия ( $P$ ) по Стьуденту.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Принимаясь за разрешение поставленных в настоящей работе задач, прежде всего следовало установить влияние различных доз бактериального антигена на поглотительную и антителообразовательную функции РЭС. Исследования показали (табл. I), что при интравенозном введении крысам малых доз бактериального антигена (1 млн.) поглотительная способность РЭС практически не изменяется, а выработка антител заметно активизируется. Напротив, применение того же антигена в больших количествах (10 млн. и выше) вызывало кратковременную стимуляцию поглощения и длительное возбуждение антителогенеза.

Отсутствие строгого параллелизма в возникновении, развитии и исчезновении обеих поствакцинальных защитных реакций РЭС намекало на независимое их протекание в целостном организме. Однако, для проверки сказанного необходимо было еще их изучить и другими функциональными методами. Не исключалась возможность того, что обе защитные функции РЭС развиваются в организме в тесной взаимосвязи, но в силу методических причин она не выявляется. Поэтому в следующих опытах поглотительная способность РЭС изучалась с помощью коллоидального раствора угольных частиц (туши) марки С-II-I4I3/a по Альперну и соавторам (Halpern et al., 1951), в модификациях Э.Д. Степаняна (1969). При этом иммунизированным крысам внутривенно инъецировалось 2I мг/100 г уголь-

Таблица I  
Изменения поглотительной и антителообразовательной функции РЭС при инъекции различных доз бактериального антигена белды крысам

| С е р и я  | Количество белых мышей (в % к общему числу) | Число живых на поглотившие антигены | на антигены   | Норма         | К о н г о р т - и н д е к с (%) |               |               |              | Титр агглютининов |       |       |       |
|------------|---|-------------------------------------|---------------|---------------|---------------------------------|---------------|---------------|--------------|-------------------|-------|-------|-------|
|            |   |                                     |               |               | 3 ч.                            | 4 д.          | 8 д.          | 12 д.        |                   | 16 д. | 4 д.  | 8 д.  |
| 1. I мл.   | 5   | 6                                   | 55 $\pm$ 0,54 | 57 $\pm$ 0,70 | 52 $\pm$ 1,1                    | 54 $\pm$ 1,3  | -             | -            | I:75              | I:200 | I:100 | I:50  |
| 2. 10 " "  | 5   | 4                                   | 51 $\pm$ 1,04 | 44 $\pm$ 0,90 | 41 $\pm$ 1,09                   | 54 $\pm$ 0,4  | 55 $\pm$ 1,7  | -            | I:100             | I:250 | I:100 | I:50  |
| 3. 100 " " | 4   | 5                                   | 53 $\pm$ 0,9  | 43 $\pm$ 0,70 | 40 $\pm$ 1,40                   | 50 $\pm$ 1,09 | 57 $\pm$ 0,90 | 51 $\pm$ 1,4 | I:100             | I:300 | I:125 | I:75  |
| 4. I млрд. | 6   | 3                                   | 57 $\pm$ 1,09 | 42 $\pm$ 0,77 | 38 $\pm$ 1,60                   | 43 $\pm$ 1,0  | 60 $\pm$ 1,20 | -            | I:150             | I:400 | I:133 | I:100 |
| 5. 2,5 " " | 7   | 5                                   | 52 $\pm$ 1,1  | 40 $\pm$ 1,4  | 35 $\pm$ 2,0                    | 44 $\pm$ 0,9  | 50 $\pm$ 1,4  | 55 $\pm$ 1,3 | I:100             | I:500 | I:200 | I:133 |

ПРИМЕЧАНИЕ: Степень достоверности разницы (P) колебалась в пределах  $P < 0,01$  -  $< 0,05$

ных частиц на 2% растворе двууглекислой соды и 0,85% растворе поваренной соли. В остальном постановка и учет так называемой "карбоновой пробы" производились таким же образом, как и при конгорот-пробе. Однако разница заключалась в том, что относительная концентрация угольных частиц в 4-х и 30-и мин. пробах крови устанавливалась нефелометрически на ФЭК-Н-57.

Из тех же соображений антителогенез у белых крыс изучался не по титру агглютининов, а гемолизинов, вырабатываемых в ответ на парентеральное введение эритроцитов барана.

Результаты, добытые посредством карбоновой пробы в реакции гемолиза (РГ), в основном оказались аналогичными с таковыми, полученными в прошлых опытах с конгорот-пробой и реакцией агглютинизации. Отсюда с большей уверенностью можно было полагать, что поглотительная и антителообразовательная функции РЭС протекают в организме самостоятельно и они несколько не зависят от способов их изучения. Вместе с тем сходные результаты, обнаруженные неодинаковыми методами изучения РЭС, служили веским доказательством их высокой точности и объективности.

Все же проведенными исследованиями не устранялось допущение о совместном функционировании поглотительной и антителообразовательной деятельности РЭС при воздействии качественно иного болезнетворного раздражителя на организм. Поэтому для окончательного разрешения данного вопроса в качестве патогенного агента использовались рентгеновые лучи, вызывающие в РЭС не только глубокие функциональные и структурные нарушения, но и специфически возбуждающие ее защитно-физиологические свойства.

Подопытные крысы облучались тотально на установке РУМ-II в дозах 50, 100, 300, 500 и 750р. Конгорот-проба на них ставилась до и в различное время после облучения. Антителогенез изучался на отдельных животных, иммунизированных бруцеллезным антигеном через сутки после облучения.

Как выяснилось (табл.2), облучение крыс в дозе 50р не влияет, а в дозах 100р и выше вплоть до абсолютно смертельной (750р) изменяет фагоспособность РЭС волнообразно: сначала кратковременно подавляет, а затем длительно стимулирует ее. При этом общее состояние облученных животных положительно коррелировало с динамикой пострадиационных изменений поглотительной способности РЭС.



Таблица 2

Изменения поглотительной и антителообразовательной функции РЭС при  
воздействии различных доз рентгеновых лучей на организм

| К<br>и<br>р<br>е<br>С | Ко<br>л<br>и<br>ч<br>е<br>с<br>т<br>в<br>о<br>(р) | Ко<br>л<br>и<br>ч<br>е<br>с<br>т<br>в<br>о<br>ж<br>и<br>в<br>о<br>т<br>н<br>ы<br>х<br>н<br>а<br>п<br>о<br>л<br>о<br>-<br>ш<br>е<br>н<br>н<br>е<br>а<br>н<br>т<br>и<br>-<br>т<br>е<br>л<br>о<br>-<br>г<br>е<br>н<br>е<br>з | К о н т р о л ь - и н д е к с (%) |         |         |         |         | Т и т р а г г л у т и н и н о в |         |               |              |                |                |                |
|-----------------------|---|---|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------------------------------|---------|---------------|--------------|----------------|----------------|----------------|
|                       |   |   | ч е р е з                         |         |         |         |         |                                 |         |               |              |                |                |                |
|                       |   |   | 3 ч.                              | 4 д.    | 8 д.    | 12 д.   | 16 д.   | 4 д.                            | 8 д.    | 12 д.         | 16 д.        |                |                |                |
| 1.                    | 50  | 10  | 5                                 | 58±2,45 | 62±3,30 | 57±1,66 | 56±2,65 | 60±0,76                         | -       | I:100<br>I:50 | I:25<br>I:50 | I:400<br>I:700 | I:400<br>I:300 | I:250<br>I:300 |
| 2.                    | 100   | "-  | 6                                 | 50±1,35 | 60±1,48 | 32±1,72 | 34±1,48 | 41±0,81                         | 53±0,77 | I:25          | I:400        | I:400          | I:400          | I:250          |
| 3.                    | 300   | "-  | 5                                 | 51±2,28 | 67±2,57 | 34±1,80 | 31±0,69 | 43±0,63                         | 48±0,75 | нет           | I:50         | I:100          | I:100          | I:150          |
| 4.                    | 500   | 8   | 7                                 | 53±2,60 | 69±3,80 | 30±3,50 | 41±1,62 | 42±0,84                         | -       | нет           | I:50         | I:100          | I:100          | -              |
| 5.                    | 700   | 12  | 10                                | 55±1,33 | 70±2,30 | 38±2,0  | 36±1,74 | -                               | -       | нет           | I:25         | I:75           | I:75           | -              |

ПРИМЕЧАНИЕ: Степень достоверности различия (Р) колебалась  
в пределах  $\bar{P} < 0,01$  -  $< 0,05$

Действительно, в латентной и особенно в терминальной стадиях лучевых поражений фагоцитоз угнетался, а в стадиях мнимого благополучия и разгара заболевания - возбуждался. Все это указывало на высокую радиочувствительность РЭС и активное ее участие в патогенезе лучевых поражений. На данное обстоятельство обращалось особое внимание, поскольку оно подавало надежду на возможность управления радиочувствительностью организма путем направленного воздействия на иммунобиологические свойства РЭС. Забегая вперед, отметим, что эта надежда всецело оправдалась в последующих исследованиях значения РЭС в радиочувствительности организма.

Антителогенез у облученных в дозе 50р животных интенсифицировался. В дозе 100р он вначале подавлялся, а затем проявлялась тенденция к стимуляции. В других опытах продукция антител угнеталась тем сильнее, чем выше была доза облучения (300, 500 и 750р).

Сопоставление данных параллельного изучения поглотительной и антителообразовательной способностей РЭС между собой у облученных животных показало, что обе функции ее чаще развиваются в противоположных направлениях. Функциональная диссоциация защитных реакций РЭС у облученных животных служила убедительным доказательством раздельного их протекания в организме. Стало быть, внешне независимое функционирование обеих защитных свойств РЭС это не кажущееся физиологическое явление, обусловленное качественными и количественными особенностями вредоносных начал и методами изучения РЭС, а объективная реальность, существующая в организме. Здесь мы столкнулись с новым подтверждением правомерности высказывания Н.Ф.Гамалеи (1928) о том, что выработка антител "быть может, функционирует непрерывно, независимо от предшествующего поглощения".

Функциональное доказательство независимости протекания поглотительной и антителообразовательной способностей РЭС в свою очередь нуждалось в морфологическом обосновании. В этой связи, учитывая все возрастающий интерес, проявляемый в современной биологии к познанию иммунологических явлений на клеточном и субклеточном уровнях, представлялось немаловажным дать цитоиммунологическую характеристику действия бактериального антигена и рентгеновых лучей на защитные функции РЭС. Объектами намеченных

исследований служили клетки селезенки и костного мозга, преимущественно состоящие из элементов РЭС. Критериями цитологических изменений служили митотическая активность и число клеток с хромосомными перестройками.

Анализ накопленного фактического материала вскрыл ряд закономерностей. К их числу относится то, что внутривенная иммунизация крыс различными дозами (1, 10, 100 млн., 1 и 2,5 млрд.) бактериального антигена почти одинаково повышают митотическую активность клеток селезенки и костного мозга. Митоз повышается с 3-го часа после иммунизации, на 4 и 8 дни он достигал максимума, а к 12 и особенно 16 дням нормализовался. При этом поствакцинальная стимуляция митозов происходила за счет увеличения числа клеток, вступающих в процесс деления, а не замедления темпа его. В то же время число клеток с хромосомными нарушениями варьировало в допустимых пределах (2-5%).

Обращаясь к данным антителогенеза и митотической активности клеток, необходимо отметить, что они изменялись синхронно лишь в сравнительно поздних этапах иммуногенеза.

Но самое главное, этими и другими исследованиями выяснилось, что у иммунизированных животных поглотительная способность РЭС и митотическая активность клеток селезенки и костного мозга, как правило, изменяются однонаправленно.

Из всего изложенного можно предположить, что, во-первых, усиление митозов в указанных тканях происходило главным образом за счет элементов РЭС или генетически подобных им клеток. Во-вторых, поствакцинальная стимуляция фагоспособности РЭС обуславливается как активизацией функции, так и увеличением числа клеточных элементов и, следовательно, поглотительной емкости.

Иные факты обнаружались при исследовании влияния различных доз рентгенового облучения на цитологические показатели тканей селезенки и костного мозга белых крыс. Так, однократное облучение животных в дозе 25 и особенно 50р несколько повышало митоз, тогда как в дозах 100, 300 и 750 р изменяло его двухфазно: вначале кратковременно подавляло, а потом более длительно стимулировало. В дальнейшем митотическая активность клеток у выздоравливающих животных постепенно приближалась к норме, а у погибающих вновь снижалась. Выход аберранных клеток находился в гра-



дуальной зависимости от дозы рентгенового облучения.

Сравнение пострадиационных сдвигов митотической активности клеток и хромосомных повреждений выявило между ними обратные взаимоотношения. Выразались они в том, что с подавлением митозов число аберрантных клеток нарастало, и, наоборот.

Из описанных результатов следовало, что митотическое деление может служить не только чувствительным показателем биологического действия радиации на организмы, но и своеобразным защитно-морфологическим приспособлением, благодаря которому элиминируются поврежденные структуры клеток. На такую возможность указывают и другие исследователи (Н.Ф. Баракина, 1957; Н.Ф. Баракина, М.И. Янушевская, 1966; Э.Д. Степанян, 1969; *Curtis et al.*, 1964; *Rogers*, 1957; *Curtis*, 1968).

При оценке данных пострадиационного изменения защитных функций РЭС выявились более сложные корреляции между ними и митотическим делением клеток. Так, при облучении животных в дозе 50p поглотительная способность РЭС по существу не нарушалась, а выработка агглютининов и митотическое деление клеток несколько активизировались. Наоборот, при облучении крыс в дозе 100p и выше (300 и 750p) поглощение и митоз вначале синхронно подавлялись, а затем стимулировались. В этих условиях антителогенез, как правило, угнетался. Эти и подобные им факты позволили предположить, что антителогенез и особенно митотическое деление клеток являются соотносительно более чувствительными и лабильными индикаторами биологического действия ионизирующей радиации на организм, чем поглотительная способность РЭС.

Итак, вырисовывалась общая картина, согласно которой характер корреляционных отношений между защитными функциями РЭС и цитологическими показателями как у иммунизированных, так и облученных животных во многом предопределяется конкретными условиями экспериментирования. К ним относятся вид, сила и время действия испытуемых раздражителей, физиологическое состояние организма, пороги возбудимости реагирующих систем, разрешающие способности применяемых методов и пр. И тем не менее, отвлекаясь от частных фактов, можно полагать, что митотическое деление клеток находится в более тесной корреляции с явлением поглощения, нежели антителогенезом.

Установив значение характера и силы действия бактериально-го антигена и рентгеновых лучей в биологических эффектах, следующие исследования посвящались выяснению роли фактора времени в поствакцинальных изменениях антителогенеза и митотической активности клеток селезенки и костного мозга белых крыс. Соответствующие показатели снимались у подопытных животных до и после одно- и двукратной внутривенной иммунизации их бруцеллезным антигеном. Оказалось, что после однократной вакцинации животных митоз, как обычно, активизируясь через 3 часа, держится продолжительное время на достаточно высоком уровне и только к 12 дню он возвращается к исходным величинам. Между тем антитела обнаруживались в сыворотке крови животных на 4-ый день иммунизации. В дальнейшем они варьировали в различных титрах вплоть до завершения опытов (16 день).

Расхождения между наблюдаемыми показателями еще более усугублялись при двукратной вакцинации животных с различными интервалами. Так, образование антител в основном угнеталось тем сильнее, чем больше времени пролегало между двукратными вакцинациями. Митотическое же деление клеток в ранние (1, 4 и 8 дни) сроки после реиммунизации стимулировалось, а в поздние (12 и 16 дни) - вслед за подъемом, колебалось в пределах нормы. Повидимому, угнетение антителогенеза при дробной вакцинации обуславливалось как перераздражением защитно-физиологических приспособлений организма вследствие неоптимального распределения во времени, так и эндотоксическим влиянием убитой бруцеллезной культуры на иммунокомпетентные клетки, продуцирующие антитела. В этих же исследованиях корреляционные отношения между процессами образования антител и митотическим делением клеток продолжали носить непостоянный характер.

Рассматривая результаты двукратной иммунизации животных, можно заметить отсутствие аддитивного действия антигенов на митоз в ранние (1, 4 и 8 дни) и весьма кратковременная их стимуляция в поздние (12 и 16 дни) сроки после реиммунизации. Чтобы разобраться в полученных фактах, были поставлены дополнительные опыты, в которых выяснилось, что на 4-ый день после интравенозного введения различных количеств (0,0001-10 млрд.) бактериальных тел митотическое деление клеток костного мозга изменяется



приблизительно однозначно. Исходя из этого, отсутствие суммации эффектов стимуляции митозов на повторное вприскивание антигена можно было истолковать тем, что первичная вакцинация, почти независимо от ее дозы, каким-то образом исчерпывает потенциальные возможности тканей к новому подъему митотического деления клеток. Разумеется, данное объяснение предполагает и другие его варианты, о которых разговор пойдет в соответствующем месте.

Что же касается быстрого прекращения антигенной стимуляции митозов в поздние (12 и 16 дни) сроки после реиммунизации, то этот интересный вопрос сделался предметом специального изучения. Выяснилось, что аналогичное явление при прочих равных условиях экспериментирования наблюдается и при двукратной внутривенной иммунизации растворимым антигеном (сыворотка лошади). Далее оказалось, что в ответ на реиммунизацию бактериальным антигеном в поздние сроки (12 и 16 дни) митозы активизируются весьма кратковременно (3 и 6 час.) и столь же быстро возвращаются к мнимой "норме". В отличие от этого перекрестное внутривенное применение сначала бруцеллезного, а затем на 12 и 16 дни паратифозного антигенов вызывало длительную стимуляцию митозов, как после однократной иммунизации.

На основании этих фактов удалось выявить специфическую природу быстрого прекращения стимуляции митозов в поздние сроки (12 и 16 дни) реиммунизации животных. Становилось очевидным, что выпадение клеточной реакции на реиммунизацию в сравнительно ранний период (1, 4 и 8 дни) после начальной вакцинации вызывалось преимущественно неспецифическими, а в поздний - (12 и 16 дни) - специфическими иммунологическими явлениями. В свете сказанного нам схематически представляется, что на антигенное раздражение клетки костного мозга реагируют как неспецифическими, так и специфическими реакциями. Со временем после момента вакцинации неспецифические иммунологические реакции постепенно ослабевают с прогрессивным усилением специфических. Эти сопряженные явления развиваются от генерации к генерации клеток и на 12 и 16 дни в тканях костного мозга вакцинированных животных четко проявляется активно выработанный специфический иммунитет.

Но помимо всего активный характер поствакцинального иммунитета доказывался еще результатами параллельного изучения поглотительной функции РЭС, кислородного обмена и митотического деления



клеток селезенки и костного мозга белых крыс. При этом учитывалось потребление внешнего кислорода по И.И.Калабухову (1957) и напряжение его в коре, подкоре головного мозга, а также в костном мозгу методом полярографии по А.Д.Снежко (1961) в модификации Э.Д.Степаняна (1969). В разнообразно поставленных опытах выяснилось, что у однократно вакцинированных крыс поглотительная функция РЭС и кислородный обмен, как правило, активизируются синхронно, а у ревакцинированных - асинхронно. А именно, фагоспособность РЭС и потребление свободного кислорода после кратковременной стимуляции нормализуются на фоне длительного повышения напряжения кислорода в исследуемых тканях. Опираясь на собственные и литературные данные, можно заключить, что иммунизаторное усиление кислородного обмена связано не столько с активизацией деления клеток, сколько подготовкой их к митозу. И поскольку иммунологическая перестройка организма сопровождалась затратой энергии дыхания, мы вправе думать, что в наших условиях иммунитет выражается отнюдь не понижением, а повышением реактивности организма. В этом смысле мы разделяем точку зрения тех ученых и прежде всего А.А.Богомольца (1958), который рассматривал явление иммунитета "как высокую степень повышенной чувствительности (сенсбилизации) организма".

Выяснив существенное значение фактора времени в поствакцинальных изменениях защитных функций РЭС и митотического деления клеток, представляло определенный интерес изучение этого же вопроса при фракционированном воздействии рентгеновых лучей на организм. Теоретическими и экспериментальными предпосылками для проведения исследований в указанном направлении служили главным образом черты сходства в биологических действиях бактериального антигена и рентгеновых лучей на защитные функции РЭС, а также реальная возможность общности иммунных механизмов, лежащих в основе формирования поствакцинальной и пострадиационной устойчивости организма.

Опуская детали аранжировки опытов, заметим, что результаты двукратного облучения вначале 100, а затем 300 и 500р животных с различными интервалами, с одной стороны, уточнили и подтвердили достоверность предыдущих данных о влиянии однократного облучения на РЭС и митотическое деление клеток, а с другой - до-

полнили их новыми фактами. В частности, как при однократном, так и двукратном облучении животных с различными промежутками времени (1, 4, 8, 12 и 16 дней) вновь проявлялись обратные взаимоотношения между митотическим делением клеток и хромосомными повреждениями. Более того, обнаружилось, что выход абберантных клеток у реоблученных с короткими (4 и 8 дней) интервалами животных увеличивается, а с продолжительными (12 и 16 дней) — уменьшается. Отсюда было сделано допущение, что в поздние (12 и 16 дни) сроки после облучения животных в сублетальных дозах (100р) в пораженных клетках селезенки и костного мозга усиливаются процессы восстановления и радиостойчивость. И поскольку в прошлых опытах к указанному времени вырабатывался своеобразный противобактериальный иммунитет, можно предположить, что в основе пострадиационной устойчивости организма лежат сходные иммунобиологические явления.

Однако сильным аргументом в пользу признания иммунобиологической природы образования пострадиационной резистентности служили результаты комплексного изучения влияния бактериального антигена и рентгеновых лучей на цитологические показатели костного мозга и радиочувствительность белых крыс. Животные подвергались общему облучению (750р) в одних случаях через 10 мин., а в других — 4 дня после внутривенной иммунизации их фруцеллезным антигеном. Опыты показали, что иммунизация за 10 мин. и особенно 4 дня до последующего облучения повышает выживаемость животных до 75% и заметно ослабляет повреждающее действие проникающего излучения на хромосомы и отчасти митотическое деление клеток костного мозга. Очевидно, предварительная иммунизация на самом деле облегчает течение лучевых поражений и повышает радиорезистентность организма (Н.Н.Клемпарская с соав., 1968).

Придавая важное значение цитологическим исследованиям в познании морфогенеза прививочного иммунитета, последующие опыты были направлены на выяснение характера корреляционных отношений между некоторыми клеточными и серологическими показателями иммунитета. Реализация настоящих исследований осуществлялась путем одновременного определения митотической активности клеток селезенки и костного мозга, количества плазмоцитов по Г.А.Гурвич и Г.В.Шумаковой (1957), числа антителообразующих клеток по Эрне



и Нордину (*Ferne, Nordin, 1963*), а также интенсивности образования гемолизина (РГ).

Как выяснилось, на внутривенную иммунизацию отмытыми эритроцитами барана цитоиммунологические сдвиги в селезенке и костном мозгу наступали намного раньше и энергичнее, чем выработка гемолизина. Причем, поствакцинальные изменения митотической активности селезенки положительно коррелировали с плазмоцитарной ее реакцией. Между тем показатели обоих клеточных тестов вместе чаще расходились с серологическими данными антителигена.

Рассматривая указанное расхождение через призму собственных и литературных данных (Г.А.Гурвич, Г.В.Шумакова, 1957, 1960), мы все больше склонялись к мысли о том, что цитологические и серологические показатели иммунологической реактивности изменятся в организме одновременно, но в силу ряда обстоятельств, и в первую очередь низкой чувствительности применяемых методов изучения, тесная взаимосвязь между ними не всегда поддается выявлению. И поэтому внешне создается кажущееся впечатление о раздельном их протекании в иммунном организме.

Но если согласиться с представлением об одновременном и параллельном развитии иммуноморфологических изменений клеток и образования антител, то логично также признать, что функциональная активизация клеток, занятых выработкой антител, сопровождается усилением их пролиферации. Здесь мы, вслед за И.А.Аловым (1964), вправе повторить, что не во всех случаях "работающая клетка не делится, а делящаяся клетка не работает".

Не обсуждая вопрос о сущности антигенного усиления пролиферации клеток, вскользь остановимся на одной из ее сторон, недостаточно освещенной в цитологии. Речь идет о собственно защитно-морфологической роли процесса деления клеток, о которой И.И.Мечников еще в 1892 г. писал, что зараженный инфекционным агентом парамециум избавляется "при всяком последующем делении от некоторого количества своих паразитов". Хотя аналогия не является доказательством, все же существующие уже сейчас некоторые сведения обнадеживают нас в том, что сходный защитно-морфологический механизм может иметь место и среди делящихся клеток теплокровных животных (*Okkieser & Brown, 1961; Taylor et al., 1957*;



*Maxia, Plant, 1955*). В этой связи нам представляется, что внутривенно инъецированный антиген по-разному возбуждает защитно-физиологические приспособления организма. В частности, в селезенке и костном мозгу иммунизаторное возбуждение внешне проявляется в виде стимуляции образования антител и усиления деления клеток. Биологическое значение их можно видеть в обезвреживании чужеродного антигена и восстановлении относительного постоянства внутренней среды организма.

Стало быть, в наших исследованиях взаимоотношения функциональной и митотической активности клеток организма носили не антагонистический, а синергический характер (И.А.Алов, 1964; С.Я.Залкинд, 1966 и др.).

Сравнительно ранние функциональные изменения в РЭС, равно как и цитологические сдвиги в тканях селезенки и костного мозга при воздействиях бактериального антигена и рентгеновых лучей на организм, указывали главным образом на участие нервной системы. Поэтому в очередных исследованиях преследовалась цель выяснить роль вегетативной нервной системы (ВНС) в эффектах действия бактериального антигена на поглотительную функцию РЭС и митотическую активность клеток селезенки и костного мозга белых крыс. Фармакологическими методами с использованием вегетотропных препаратов, избирательно выключающих или возбуждающих деятельность симпатической или парасимпатической иннервации, были вскрыты ряд закономерностей. Так, например, у интактных белых крыс возбуждение симпатикуса адреналином (0,1 мг/100г) вначале непродолжительно подавляло фагоспособность РЭС и митоз, а потом длительно их стимулировало. Напротив, выключение ее деятельности эрготоксином (1 мг/100г) и особенно аминазином (1 мг/100г) активизировало фагоцитоз и митотическое деление клеток. Усиление же функции парасимпатикума пилокарпином (1,5 мг/100г) синхронно активизировало поглощение РЭС и пролиферацию клеток. Введение раствора атропина (6 мг/100г) резко тормозило фагоцитоз и неожиданно возбуждало деление клеток. К тому же нейротропные вещества изменяли митотическую активность, преимущественно действуя на ранние (П+М), нежели поздние (А+Т) этапы кариокинеза клеток костного мозга. По-видимому, в норме симпатический отдел ВНС оказывает тормозное, а парасимпатический ее отдел-возбуждающее влияние на погло-

тельную функцию РЭС и отчасти на митотическое деление клеток селезенки и костного мозга белых крыс.

Иные результаты обнаружались при изучении влияния тех же вегетотропных препаратов на митотическую активность клеток вакцинированных белых крыс. Достаточно сказать, что применение тех же испытуемых препаратов не оказывало какого-либо заметного влияния на поствакцинальную стимуляцию митотического деления клеток. Создавалось мнение, что предварительная иммунизация блокирует действие вегетотропных препаратов на митоз.

Описанное явление особенно наглядно представилось в исследованиях значения денервации задней конечности в регуляции иммунобиологических функций РЭС, а также митотического деления клеток селезенки и костного мозга. Выяснилось, что неполная денервация одной из задних конечностей белых крыс путем перерезки седалищного (*n. ischiadicus*) и бедренного (*n. femoralis*) нервов вызывает длительную (16 дней) стимуляцию митозов сперва в костном мозгу оперированной, а затем контралатеральной конечности. При этом поглотительная способность РЭС подавлялась, а выработка антител имела тенденцию к усилению. В селезенке митотическое деление клеток интенсифицировалось параллельно с активизацией митозов в костном мозгу неденервированной ("контрольной") конечности. Причем постденервационная стимуляция пролиферации клеток обуславливалась в основном увеличением числа клеток, вступающих в митоз.

Именно в последующих опытах, пытаясь как-то повлиять на неудержимый ход последенервационной стимуляции митозов, мы снова встретились с явлением, ранее наблюдаемым при инъекции вегетотропных средств предварительно иммунизированным животным. На этот раз оно выражалось в том, что впрыскивание животным с денервированной конечностью некоторых вегетотропных препаратов (адреналин, пилокарпин), а также бактериального антигена, фактически не изменяло обычную постденервационную стимуляцию митозов в костном мозгу обеих конечностей.

В стремлении дать объяснение указанному явлению можно было полагать, что клетки, вовлеченные в поствакцинальный или постденервационный процесс, используют весь пластический и энергетический материал и они становятся рефрактерными к последующим



воздействиям (химическим, биологическим и пр.). Не исключена также возможность выхода интенсивно делящихся клеток тканей из-под регулирующего влияния нервной системы, в результате чего испытуемые раздражители не оказывают опосредованного через нее влияния на митотическое деление клеток.

Сам по себе факт стимуляции митозов в костном мозгу денервированной конечности также удовлетворительно истолковывается ослаблением нервной регуляции деления клеток и растормаживанием его (Д.Мэзия, 1963). По-видимому, в норме периферическая нервная система оказывает преимущественно тормозное влияние на митотическое деление клеток (С.Я.Залкинд, 1954). С этих же позиций представляется возможность понять парадоксальную стимуляцию митозов в костном мозгу неоперированной конечности. Очевидно, в костном мозгу денервированной конечности в результате нарушения митозов образуются или высвобождаются какие-то гуморальные вещества. Эти гипотетические вещества, будучи следствием хирургической перерезки нервов, током крови переносятся в костномозговую ткань неоперированной конечности, где они становятся причиной функциональной "денервации" костного мозга и стимуляции митозов. Возможность функциональной "денервации" тканей подкрепляется многочисленными сведениями из общей физиологии и патологии нервной системы (Н.Е.Введенский, 1953; Л.А.Орбели, 1961 и др.)

Относительно упомянутых выше расхождений между защитными функциями РЭС и митотическим делением клеток у животных с денервированной конечностью можно лишь допустить, что они обуславливались развитием дистрофических явлений в денервированной конечности патогенной импульсацией, исходящей из центральных отрезков перерезанных нервов (Л.А.Орбели, 1962).

Для полноты изучения корреляционных связей между испытуемыми функциями и структурами, а также степенью участия элементов РЭС в индуцированных митозах, требовалось еще выяснить динамику изменения видового состава клеток костного мозга при воздействиях тех же патогенных раздражителей на организм. С этой целью подопытные крысы декапитировались в различные (3 час., 1, 4, 8 и 12 дни) сроки после внутривенной иммунизации бруцеллезным антигеном или общего рентгенового облучения. Из периферической крови и костного мозга готовились мазки-препараты и после окрашивания по Паппенгейму в них определялся морфологический состав



клеток. Полиморфные клеточные элементы идентифицировались по известной цитоммунологической классификации, принятой на Пражской конференции (1960) и дополненной М.П.Покровской с соав. (1965). Для облегчения цитологического анализа отдельные клетки эритро- и миелобластических рядов объединялись по степени их морфологической дифференциации на "молодые" и "зрелые" (И.А. Кассирский, 1960). К "молодым" клеткам красного ростка относились: проэритробласты, пронормобласты и базофильные нормобласты, а "зрелым" - оксифильные и полихроматофильные нормобласты. К "молодым" клеткам белого ростка причислялись: миелобласты, промиелоциты и миелоциты, а "зрелым" - палочкоядерные и сегментоядерные.

Наряду с морфологическими исследованиями в периферической крови подсчитывалось количество эритроцитов и лейкоцитов.

Поствакцинальные изменения в периферической крови в основном характеризовались более или менее постоянством числа эритроцитов и лейкоцитов. В гемограмме отмечалась лейкопения, относительный лимфоцитоз, нейтропения с умеренным ядерным сдвигом влево, эозинопения и моноцитоз. Нейтропенический тип изменения лейкоформулы крови отражался в миелограмме в виде увеличения общего числа клеток эритробластического ряда за счет умеренного повышения количества молодых и зрелых его форм. Наиболее резкие сдвиги констатировались среди клеток миелобластического ряда. Так, процентное содержание зрелых клеток уменьшалось на фоне прогрессивного нарастания молодых. В начале иммунизаторного раздражения уровень эозинофилов несколько снижался, а затем повышался. Заметно увеличивалось число лимфоцитов, моноцитов, ретикуло-эндотелиальных клеток, мегакариоцитов и плазмоцитов. Важно подчеркнуть, что митоз клеток белого ростка увеличивается намного сильнее, чем красного.

Эти и другие данные говорили о более резких поствакцинальных цитологических изменениях белой крови по сравнению с красной.

Сходные результаты, в смысле преимущественного изменения элементов белой крови, были получены при рентгеновом облучении (300р) белых крыс. Действительно, тотальное облучение животных практически не влияло на число эритроцитов в периферической крови. Количество же лейкоцитов в ранние (3 час., 1 день) сроки

после облучения снижалось, а в поздние (4, 8 и 12 дней) - проявляло тенденцию к повышению. В лейкоцитарной формуле регистрировались лейкопения, эозинопения и лимфопения. В миелограмме число клеток эритроидного ряда понижалось в результате уменьшения молодых его форм. Между тем уровень клеток миелоидного ряда опускался, а зрелых - возрастал. Перечисленные цитологические сдвиги сопровождалась эозинопенией, лимфопенией и некоторым моноцитозом. Заметно нарастало количество мегакариоцитов и особенно ретикуло-эндотелиальных клеток. Митоз в ранние (3 час., 1 день) периоды после облучения круто снижался, а в поздние - (4, 8 и 12 дней) - подымался. Причем митозы интенсифицировались сильнее среди клеток белого, нежели красного ростка.

Из приведенных результатов нетрудно видеть, что как иммунизация, так и облучение животных, вызывает соответствующие цитологические изменения главным образом в белой, нежели красной крови. И поскольку подавляющее большинство клеточных элементов белой крови входит в составную часть РЭС, можно полагать, что применяемые нами болезнетворные раздражители избирательно действовали на клетки РЭС или подобные им элементы. Об этом свидетельствовал и ранее установленный факт параллельного изменения цитологических показателей и поглотительной способности РЭС у отдельно вакцинированных и облученных животных. Совпадение результатов морфологического и функционального исследований еще больше вселяло в нас уверенность в том, что РЭС является первичной точкой приложения действия бруцеллезного антигена и проникающей радиации. К аналогичному заключению пришли и многие другие авторы (П.А.Вершилова, Н.И.Кокорин, 1954а; М.А.Чернышева, 1957, 1958; П.А.Вершилова и Н.А.Грекова, 1959, 1960; П.А.Вершилова, М.А.Чернышева, 1970). С признанием этого положения логично думать, что в наших исследованиях митотическая активность клеток селезенки и костного мозга в основном изменялась за счет элементов РЭС, или функционально и генетически близко стоящих к ним клеток. Приступая к выполнению запланированных исследований, мы давали себе отчет в том, что установление корреляционных отношений между отдельными явлениями в организме не всегда позволяет с достаточной уверенностью говорить о характере их взаимосвязи или причинно-следственной зависимости. Ибо в слож-



ном организме физиологические отправления могут развиваться параллельно, не будучи сопряженными, и одна общая причина может вызывать независимые друг от друга следствия. И тем не менее нам казалось возможным путем тщательного наблюдения за изменениями корреляции между испытываемыми функциями и структурами при заведомо известных условиях судить с различной степенью приближенности об их взаимосвязи. В плодотворности такого подхода к рассмотрению корреляционных отношений мы убеждались ни раз при анализе результатов собственных исследований.

### ВЫВОДЫ

1. Рентгеновое облучение животных сравнительно высокими дозами (300 и 500р) стойко подавляет антителогенез и двухфазно изменяет поглотительную способность РЭС: вначале кратковременно угнетает, а затем длительно стимулирует ее.

2. Облучение животных, как правило, изменяет митотическую активность клеток селезенки и костного мозга волнообразно со сменой начального снижения на повышение ее. Выход аберрантных клеток бывал тем больше, чем выше доза радиации.

3. В зависимости от конкретных условий поглотительная и антителообразовательная функции РЭС, а также митотическое деление клеток могут изменяться как одно-, так и разнонаправленно.

4. Первичная иммунизация животных активизирует митоз в костном мозгу и предотвращает последующее действие на него ре-иммунизации. При этом антителогенез подавлялся тем сильнее, чем больше времени пролегало между двукратными вакцинациями.

5. Двукратное облучение с короткими (1, 4 и 8 дней) интервалами между ними усиливает, а длинными (12 и 16 дней) - ослабляет угнетающее действие радиации на митоз и хромосомы клеток.

6. Предварительная внутривенная инъекция бактериального антигена стимулирует кислородный обмен, пролиферацию клеток, поглотительную и антителообразовательную функции РЭС и заметно повышает радиоустойчивость организма.

7. У вакцинированных крыс цитологические изменения в селезенке предшествуют появлению в ней антителообразующих клеток и гемодизинов в крови.



8. В норме симпатический отдел ВНС оказывает тормозное, а парасимпатический - возбуждающее влияние на поглотительную функцию РЭС, а также митотическую активность клеток селезенки и костного мозга белых крыс.

9. Неполная денервация задней конечности резко повышает митотическую активность клеток костного мозга сначала оперированной, а затем и контралатеральной конечностей. В этих условиях антителогенез не нарушался, а поглотительная способность РЭС угнеталась.

10. Предшествующая иммунизация животных или денервация задней конечности блокирует действие ряда веществ (адреналин, пилокарпин, бактерии и пр.) на митотическое деление клеток костного мозга.

II. Изменения морфологического состава периферической крови и костного мозга при воздействиях бактериального антигена и рентгеновых лучей на организм свидетельствуют о том, что митотическая активность определялась нами преимущественно среди элементов РЭС или клеток, функционально и генетически близко стоящих к ним.

#### Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Влияние дробного облучения на поглотительную и антителообразовательную функции ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС). 1965, Известия АН Арм.ССР, 1965, 18, 3 (в соавторстве).

2. Комбинированное воздействие вегетативных ядов и проникающей радиации на отдельные иммунобиологические функции ретикуло-эндотелиальной системы. Биол.ж.Армении, 1967, 20, 1 (в соавторстве).

3. Влияние ионизирующей радиации на цитологические изменения костного мозга и фагоцитарную способность РЭС. Биол.ж.Армении, 1969, 22, 4 (в соавторстве).

4. Влияние постоянного тока и рентгеновых лучей на митотическую активность клеток костного мозга и фагоцитарную способность ретикуло-эндотелиальной системы. Материалы 3 Республиканской научной конференции молодых научных работников Армении. Ереван, 1970, с.211.

5. Влияние рентгеновых лучей на цитологические изменения клеток костного мозга в зависимости от иммунологического состояния ретикуло-эндотелиальной системы. Биол.ж.Армении, 1970, 23,1 (в соавторстве).

6. Значение фактора времени в поствакцинальных изменениях митотической активности клеток костного мозга. Биол.ж.Армении, 1971, 24,8 (в соавторстве).

7. Некоторые цитологические изменения при фракционированном облучении белых крыс. Биол.ж.Армении, 1972, 25,8 (в соавторстве).

Материалы диссертации доложены:

1. На третьей республиканской научной конференции молодых научных работников Армении, посвященной 100-летию со дня рождения В.И.Ленина. Январь, 1970 г., Ереван.

2. На заседании Ученого Совета Института зоологии АН Арм. ССР, Ереван, 1972 г.

Заказ 454

Тираж 200

Печатаю-исполнительная лаборатория Ереванского  
медицинского института, Ереван - Кирова 2