

Б. Т. ГАРИБДЖАНЫН

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ ИНТАКТНЫХ КРЫС НА АСЦИТНЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ЭРЛИХА

К наиболее актуальным задачам современной онкологии относится изучение изменений иммунобиологической реактивности организма при злокачественных заболеваниях и противораковой химиотерапии. Ранее нами было показано, что некоторые активные противораковые химиопрепараты снижают общую неспецифическую резистентность организма [3, 4]. В связи с этим интересно было изучить также влияние противоопухолевых соединений на имеющиеся в организме человека и некоторых животных защитные противоопухолевые реакции. К ним, в частности, относятся канцеролитические свойства сыворотки крови [5, 8—11], которые, по данным литературы, снижаются при злокачественном росте [2, 6, 7 и др.].

Описанные до сих пор методы определения канцеролитических свойств сыворотки крови [1, 7, 11] основаны на выявлении морфологически неизмененных опухолевых клеток до и после контакта с сывороткой в условиях *in vitro*. Но во-первых, эти методы довольно трудоемкие, во-вторых, остается неясным, как себя в организме будут вести клетки, предварительно подвергнутые воздействию сыворотки. Исходя из этого, при выполнении настоящего исследования мы попытались прежде всего применять удобный *in vitro* или *in vivo* метод для изучения канцеролитических свойств сыворотки крови интактных крыс.

Материал и методы. *In vitro* опыты осуществлялись методом суправитальной окраски и подсчета окрашенных и неокрашенных асцитных клеток Эрлиха, после различного срока их инкубации с сывороткой крови интактных крыс [12, 13], а *in vivo*—методом внутрибрюшинного введения здоровым мышам инкубированной смеси [12], оставляя затем их на выживаемость. Мышей в опыт брали на 10-ый день перевивки. В асцитической жидкости опухолевые клетки, после подсчета в камере Горяева, физиологическим раствором разводили до 10 млн в 1 мл. Далее к 5 стерильным пробиркам (пробы 1—5), содержащим по 1 мл физиологического раствора, и к 5 пробиркам (пробы 1'—5'), содержащим по 1 мл сыворотки, полученной *ex tempore* у 5 интактных крыс-самцов весом 120—140 г, добавлялось аналогичное количество суспензии асцитных клеток. После 10-кратного взбалтывания все пробы, кроме первых, инкубировали в термостате (37°) в разные сроки: 2, 2'—30 мин; 3, 3'—60 мин; 4, 4'—90 мин; 5, 5'—120 мин. По окончании инкубации (первые пробы без инкубации) часть смеси каждой пробы окрашивалась 0,05% раствором водного эозина в течение 5 мин, затем производился подсчет неокрашенных (живых) и окрашенных (мертвых) клеток. Другую часть смеси вводили мышам внутрибрюшинно по 0,2 мл (1 млн клеток), используя 8 мышей на каждую пробу. Изменение веса мышей в течение опыта регистрировалось через день до гибели первых животных данной группы, а погибших в течение опыта вскрывали для установления на-

личия или отсутствия асцита. После гибели всех животных подсчитывалась средняя продолжительность жизни (СПЖ) в каждой группе. Затем в аналогичных условиях опыт повторяли. В опытах использовано 160 мышей—самцов весом 18—20 г. Полученные результаты подверглись статистической обработке по методу Стьюдента-Фишера.

Результаты опытов и их обсуждение

Т а б л и ц а

Влияние сыворотки крови интактных крыс на асцитные клетки Эрлиха мышей в условиях совместной инкубации в термостате

№ пробы	1	1'	2	2'	3	3'	4	4'	5	5'
Срок инкубации в термостате (37°), мин	0	0	30	30	60	60	90	90	120	120
% окрашенных из 100 сосчитанных асцитных клеток	2	0	7	0	6	0	6	0	5	0

По данным таблицы, во всех контрольных пробах (асцит+физ. р-р) обнаруживаются окрашенные клетки, количество которых колеблется от 2 до 7 и не зависит от срока инкубации в термостате. В опытных же пробах (асцит+сыворотка) окрашенные клетки полностью отсутствуют. После пятиминутного кипячения пробы, когда исключается возможность существования живых клеток, асцитные клетки вновь остаются неокрашенными, в то время как в контрольных пробах после кипячения не обнаруживается ни одной неокрашенной клетки. Можно предположить, что какая-то фракция сыворотки адсорбируется оболочкой асцитных клеток, затрудняя проникновение красителя во внутрь клетки.

Результаты опытов *in vivo* показали, что у всех мышей контрольных групп получают положительные прививки (рис. 1). Животные погибают с наличием асцита, причем достоверного изменения СПЖ в зависимости от срока инкубации пробы в термостате не установлено ($\alpha < 0,95$). В первой подопытной группе, где асцит прививали с сывороткой без инкубации в термостате, положительные прививки, в отличие от контроля, были получены только у 4 из 16 привитых мышей (25%), однако животные прожили меньше контрольных (ср. рис. 1 А₁ с 1 А). Во второй подопытной группе, где асцит с сывороткой перевивали после 30-минутной инкубации в термостате, были получены почти аналогичные результаты, т. е. положительные прививки отмечались у 5 из 16 привитых мышей (31,2%), и животные погибли раньше контрольных (ср. рис. 1 Б₁ с 1 Б). С удлинением срока инкубации проб в термостате указанное действие сыворотки на организм животных несколько ослабевало. Так, например, в группах, где асцит прививали после 60-минутной, 90-минутной и 120-минутной инкубации с сывороткой, положительные прививки были получены у 9 (56,2%), 11 (68,7%) и 12 (75%) мышей из 16 привитых, а СПЖ, по сравнению с первой подопытной группой, увеличивалась на 23 ($\alpha = 0,98$), 30 и 35% ($\alpha > 0,99$) соответственно (рис. 1 В₁—Д₁). Но и в этих группах животные погибли раньше контрольных. Это, вероятно, яв-

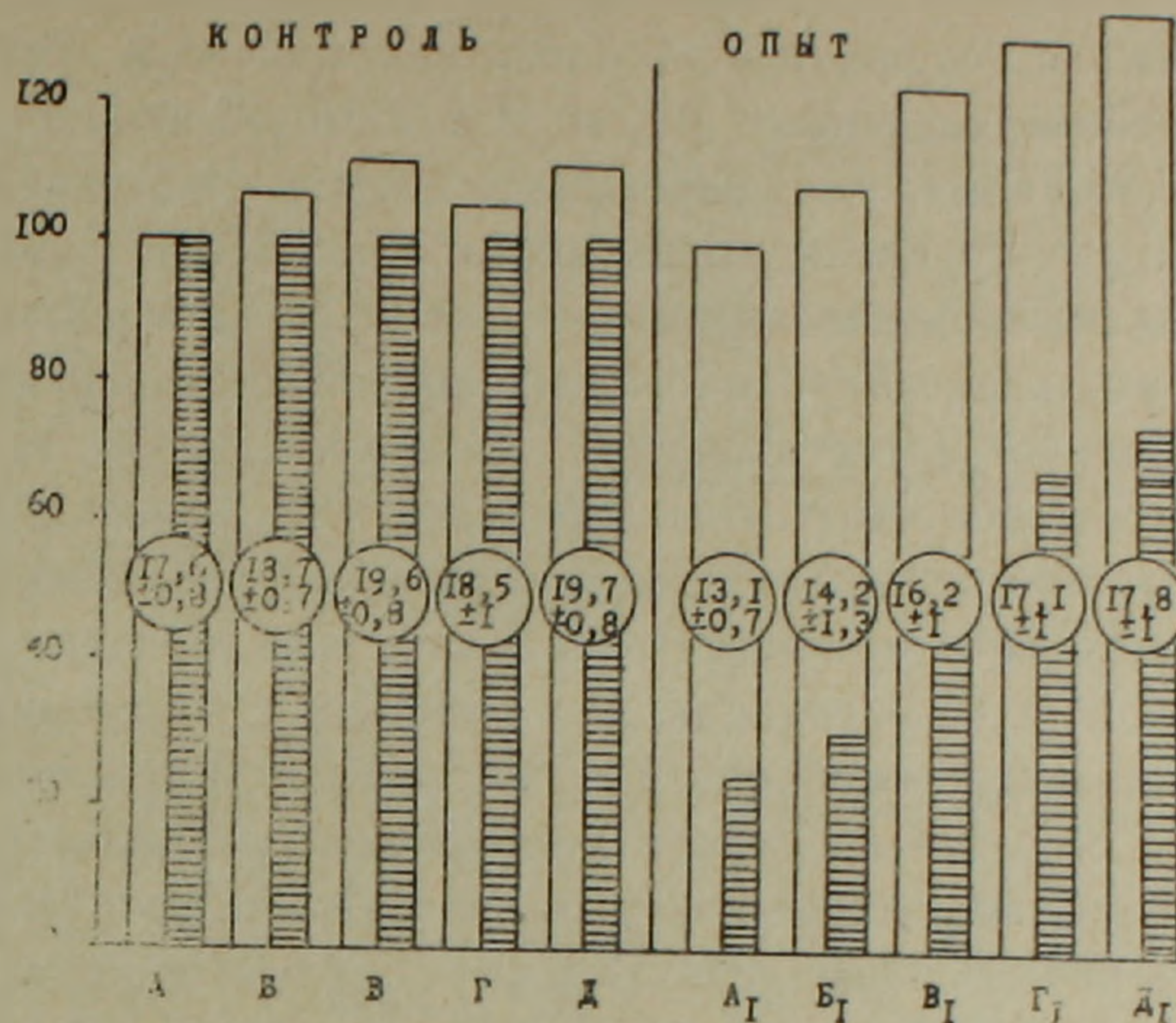


Рис. 1. Средняя продолжительность жизни (СПЖ) и процент положительных прививок у мышей, привитых асцит, смешанный с физ. раствором (А—Д) или сывороткой крови интактных крыс (А_I—Д_I) и инкубированный в термостате в разные сроки. Белые столбики—СПЖ в % (контроль принят за 100%), заштрихованные — % положительных прививок в данной группе. Кружочки—СПЖ животных в сутках. А, А_I—асцит прививали без предварительной инкубации в термостате; Б, Б_I—инкубация 30 мин; В, В_I—60 мин; Г, Г_I—90 мин; Д, Д_I—120 мин.

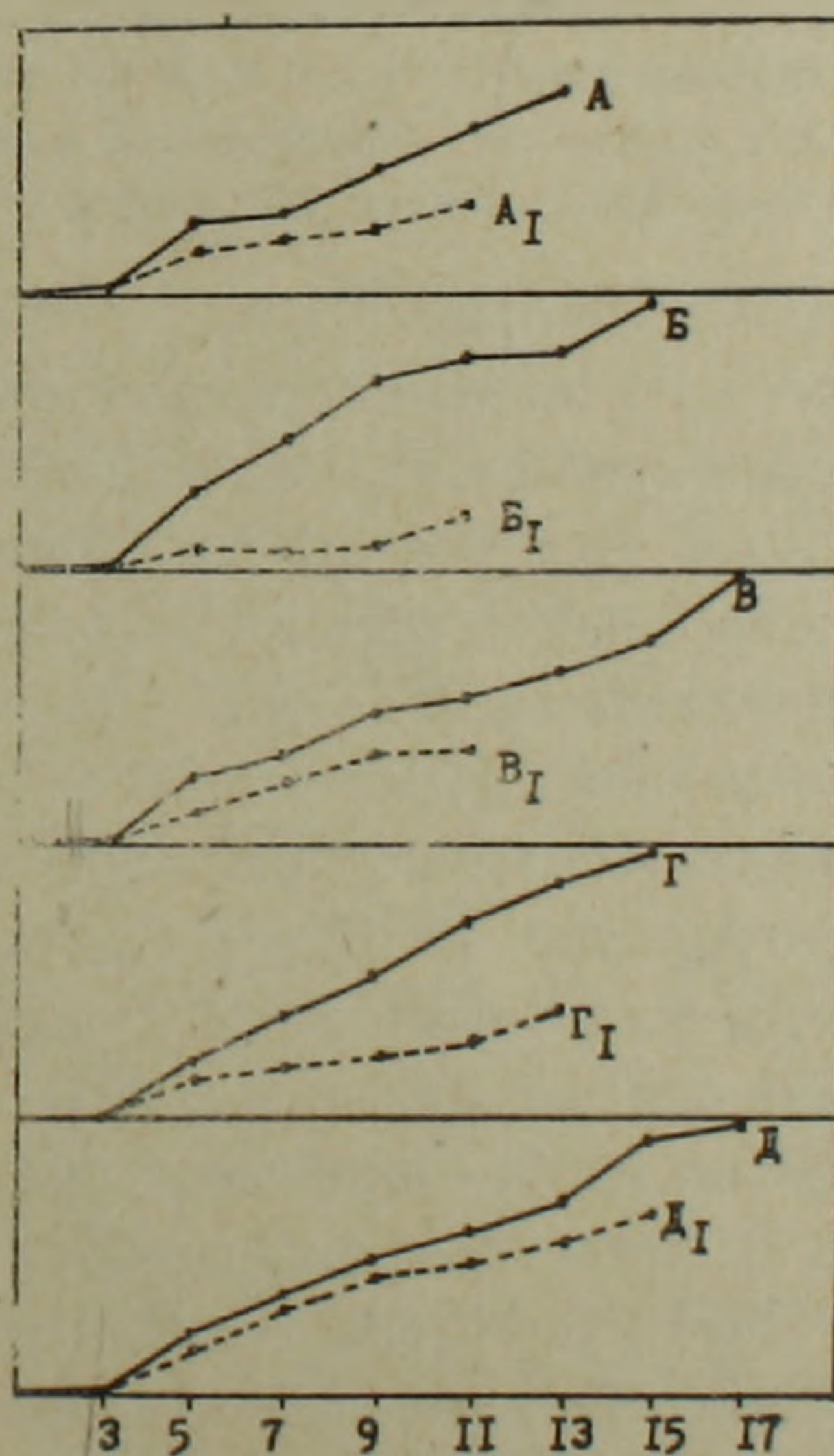


Рис. 2. Изменение веса мышей после внутрибрюшинной переливки 1 млн асцитных клеток, смешанных с физ. раствором или сывороткой крови интактных крыс и инкубированных в термостате в разные сроки. По горизонтали—дни опыта до гибели первых животных данной группы; по вертикали—изменение веса мышей в % по сравнению с исходным. Остальные условные обозначения те же, что на рис. 1.

ляется результатом токсического воздействия крысиной сыворотки на организм мышей. Приведенные на рис. 2 данные об изменении веса животных в динамике опыта показывают, что скорость накопления асцита у мышей подопытных групп, по сравнению с контролем, значительно подавлена. Таким образом, при перевивке асцита Эрлиха после различного срока предварительной инкубации с сывороткой крови интактных крыс отмечается некоторое цитостатическое действие, которое выражается в снижении процента положительных прививок и подавлении скорости накопления асцита у подопытных мышей. Кроме того, сыворотка крови оказывает общетоксическое действие на организм животных, уменьшая СПЖ во всех подопытных группах, по сравнению с контролем. В зависимости от длительности инкубации в термостате как цитостатическое, так и общетоксическое действия сыворотки несколько ослабляются.

Исходя из полученных результатов, нами была предпринята попытка разработать оптимальные условия для снижения общетоксического действия сыворотки. С этой целью во второй серии опытов прививаемый асцит смешивали не только с чистой сывороткой, но и с ее разведенными пробами.

В опыт брали 7 стерильных центрифужных пробирок. Кроме второй, все заполнялись 1 мл физиологического раствора, а вторая содержала 2 мл сыворотки, полученной ex tempore у 5 интактных крыс-самцов весом 120—140 г. Из этой пробирки отсасывали 1 мл, и ее дробно разводили по 3—7 пробиркам (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16). Далее ко всем пробиркам добавляли по 1 мл разведенной взвеси 10-дневного асцита, содержащей 10 млн клеток. После 30-минутной инкубации в термостате содержимое каждой пробирки перевивали 8 мышам по 0,2 мл и опыт продолжали как в I серии. С целью воспроизведения результатов опыт повторяли, используя 10 мышей на каждую пробу. Во второй серии экспериментов было использовано 126 мышей-самцов весом 18—20 г.

Результаты представлены на рис. 3 и 4.

Данные, полученные у контрольных мышей этой серии (асцит с физиологическим раствором), принципиально мало отличаются от результатов предыдущей серии (ср. рис. 3 А с 1 А). Положительные прививки были получены у всех животных, и мыши погибли от прогрессирующего асцита. Почти воспроизводимые результаты были получены и при перевивке асцита с неразведенной сывороткой. В этой группе асцит развивался только у 7 из 18 привитых мышей (38,8%), и животные погибли несколько раньше контрольных ($\alpha < 0,95$), хотя прожили дольше по сравнению с подопытными животными предыдущей серии (ср. рис. 3 Б с 1 Б₁). Мыши, получившие асцит с разведенной 1:1 сывороткой, прожили несколько больше контрольных и животных предыдущей группы (ср. рис. 3 В с 3 А и Б $\alpha = 0,9$). Однако в этой группе асцит развивался у 10 из 18 привитых мышей (55,5%), что свидетельствует об увеличении числа положительных прививок. При перевивке асцитных клеток предварительно инкубированной двукратно разведенной сывороткой (рис. 3 Г) СПЖ животных по сравнению с контролем увеличивалась на 40% ($\alpha > 0,99$), причем процент положительных прививок по сравнению с предыдущей группой почти не изменился (ср. рис. 3 Г с 3 В). Здесь асцит обнаруживался у 9 из 18 привитых мышей (50%).

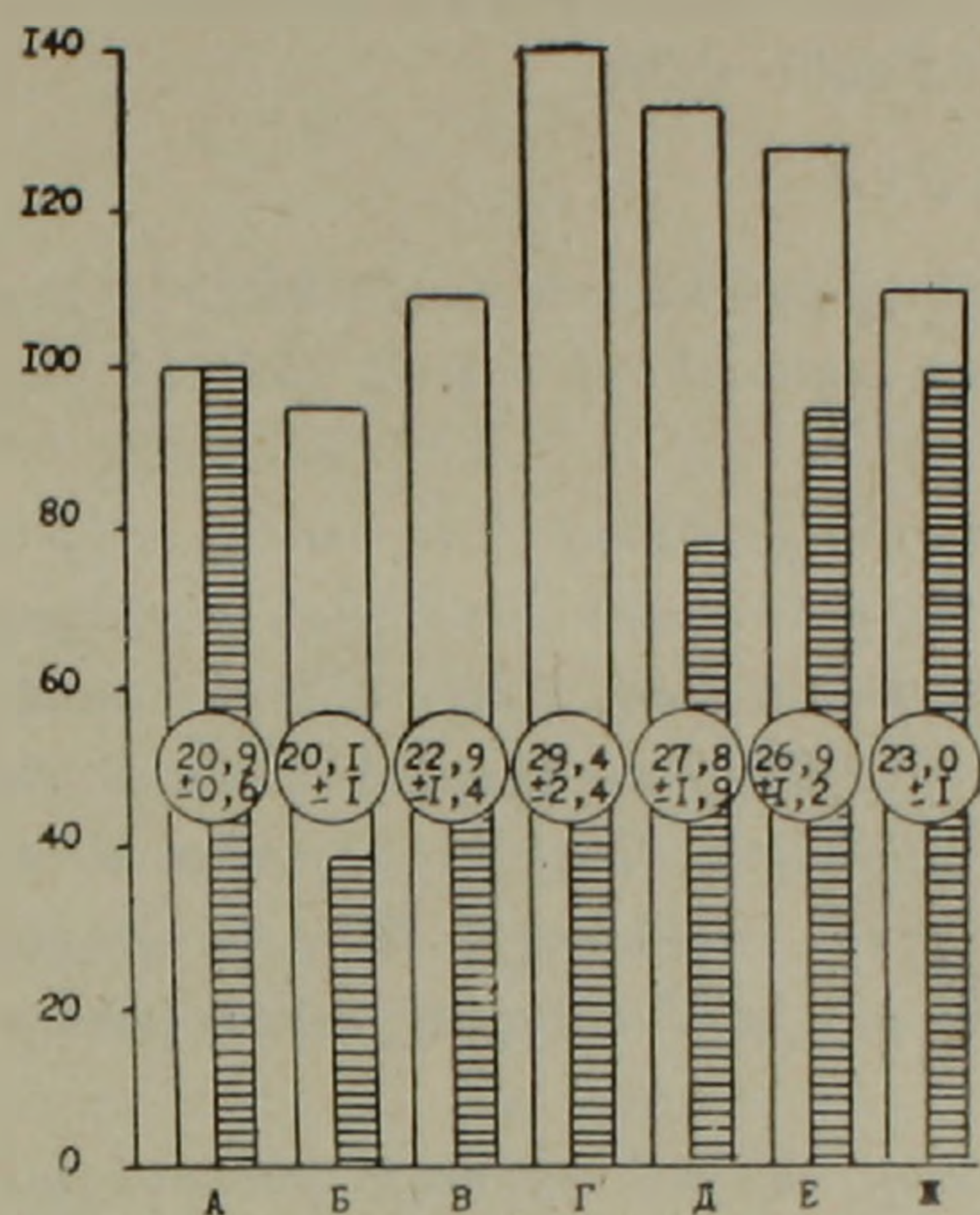


Рис 3. СПЖ и процент положительных прививок у мышей, получавших асцит, смешанный с физ. раствором (А), сывороткой крови intactных крыс (Б) или с разведенными 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 пробами сыворотки (В—Ж) и инкубированный в термостате 30 мин. Условные обозначения те же, что и на рис. 1.

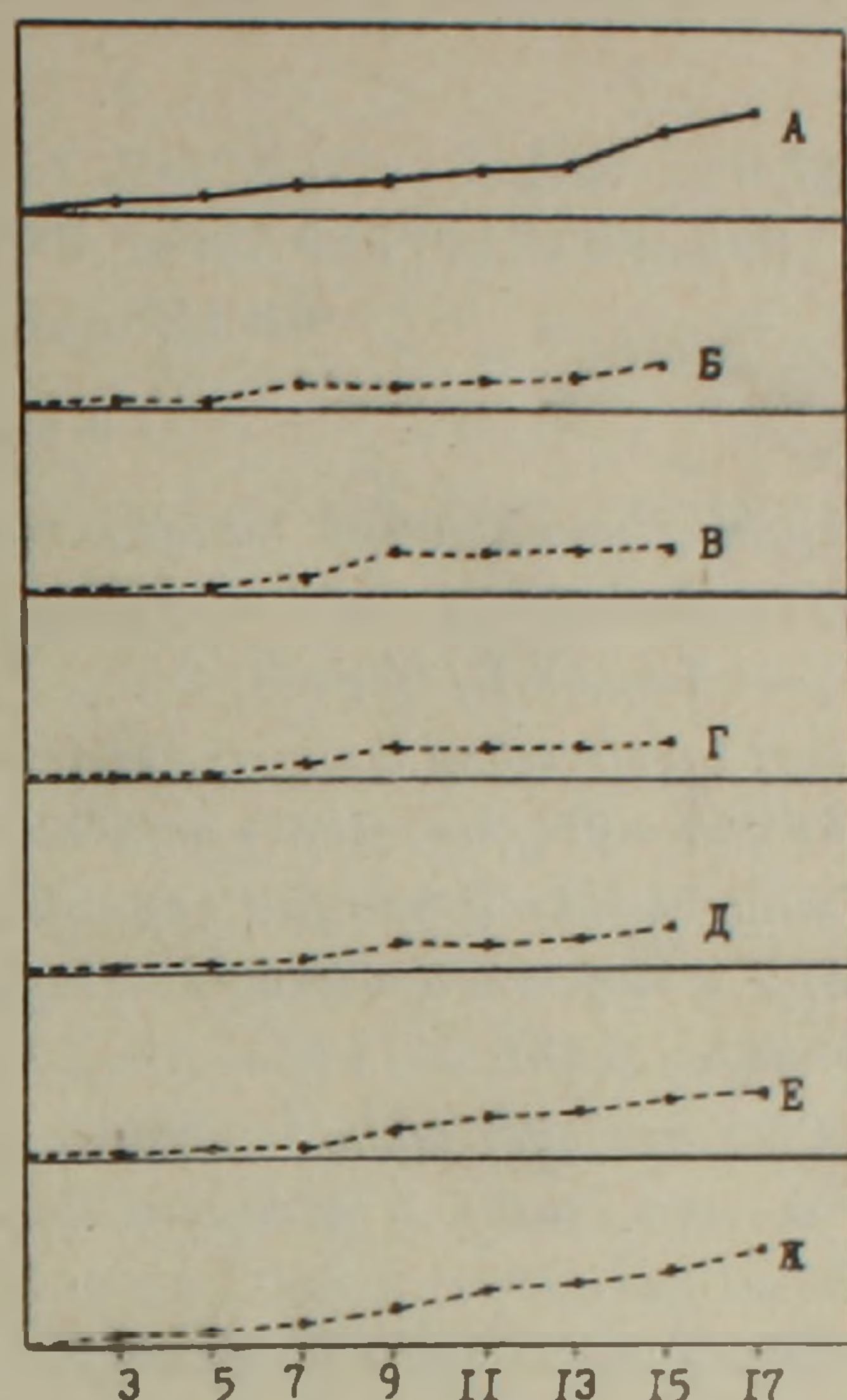


Рис. 4. Изменение веса мышей после внутрибрюшинной перевивки 1 млн асцитных клеток, смешанных с физ. раствором, сывороткой крови intactных крыс или с разведенными 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 пробами сыворотки. Условные обозначения те же, что и на рис. 2 и 3.

В остальных группах, где асцит прививали с более разведенными пробами сыворотки, отмечалось постепенное ослабление цитостатического действия, о чем свидетельствует уменьшение СПЖ животных и увеличение % положительных прививок (рис. 3 Д—Ж). Так, например, СПЖ в группах, получавших асцит с разведенной 1:4, 1:8, 1:16 сывороткой составляет 133 ($\alpha > 0,9$), 128 ($\alpha > 0,99$) и 110% ($\alpha = 0,9$) соответственно (контроль принят за 100%). Положительные же прививки в указанных группах отмечаются у 14 (77,7%), 17 (94,4%) и 18 (100%) мышей из 18 подопытных.

Следует указать, что во всех группах, кроме последней, где асцит прививали с разведенной 1:16 сывороткой, накопление асцитической жидкости по сравнению с контролем было заметно угнетено (ср. рис. 4 А с 4 Б—Ж).

Таким образом, путем разведения сыворотки крови intactных крыс физиологическим раствором можно ослабить ее общетоксическое действие на организм животных, сохраняя при этом цитостатическую активность на асцитную карциному Эрлиха. Наилучшее цитостатическое действие сыворотки обнаруживается при ее двукратном разведении.

Բ. Տ. ՂԱՐԻԲԺՋԱՆՅԱՆ

ԱՌՈՂՋ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԱՐՅԱՆ ՇԻՃՈՒԿԻ ՔԱՂՑԿԵՂԱԼՈՒԾ ՀԱՏԿՈՒԹՅԱՆ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄԿՆԵՐԻ ԷՐԼԻԽԻ ԱՍՑԻՏԱՅԻՆ ՈՒՌՈՒՑՔ
ԱՌԱՋԱՑՆՈՂ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ու մ

Էրլիխի ասցիտային ուռուցք առաջացնող բջիջների վրա *in vitro* և *in vivo* պայմաններում ուսումնասիրվել է առողջ առնետների արյան շիճուկի քաղցկեղալուծ հատկությունը:

Այդ նպատակով կատարվել է ասցիտային բջիջների և արյան շիճուկի համատեղ ինկուբացիա՝ թերմոստատի մեջ, որից հետո ինկուբացիոն խառնուրդի մի մասը ներկելով ջրային էոզինի 0,05% լուծույթով, միկրոսկոպի տակ որոշվել է կենդանի և մեռած ուռուցքային բջիջների տոկոսը, իսկ մյուս մասը ներարկելով մկներին՝ ներորոգվայնային եղանակով հաշվվել է նրանց մոտ առաջացած դրական պատվաստումների տոկոսը, ասցիտային հեղուկի կուտակման արագությունը և կենդանիների կյանքի միջին տևողությունը, կոնտրոլի համեմատությամբ:

Ապացուցվել է, որ *in vitro* եղանակը արյան շիճուկի քաղցկեղալուծ հատկությունների դրսևորման համար պիտանի մեթոդ չէ, քանի որ ասցիտային բջիջները շիճուկից կլանում են ինչ որ ֆրակցիա, որը նրանց դարձնում է անթափանցելի էոզինի նկատմամբ:

In vivo փորձերով ցույց է տրվել, որ առողջ առնետների արյան շիճուկն ասցիտի ուռուցքային բջիջների աճի նկատմամբ հանդես է բերում ընկճող ազդեցություն, պակասեցնելով ուռուցքի դրական պատվաստումների տոկոսը և թուլացնելով ասցիտի կուտակման արագությունը: Միաժամանակ նկատվում է շիճուկի ընդհանուր տոքսիկ ազդեցության դրսևորում, որի հետևանքով ըզգալի պակասում է փորձնական կենդանիների կյանքի միջին տևողությունը:

Պարզվեց, որ շիճուկը ֆիզիոլոգիական լուծույթով նոսրացնելու ճանապարհով հնարավոր է պակասեցնել նրա ընդհանուր տոքսիկ ներգործությունը օրգանիզմի վրա, պահպանելով ուռուցքային բջիջների աճը ճնշող ազդեցությունը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Вязова О. И. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, XI, 4, VII, 127, 1959.
2. Вязова О. И. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, XI, 9, VIII, 108, 1959.
3. Гарибджанян Б. Т. Вопросы онкологии, 12, X, 49, 1964.
4. Гарибджанян Б. Т., Чернов В. А. Фармакология и токсикология, 4, 434, 1969.
5. Кавецкий Р. Е. Роль активной мезенхимы в диспозиции организма к злокачественным новообразованиям. Киев, 1938.
6. Кавецкий Р. Е. Опухоль и организм. Киев, 1962.
7. Маркин С. П. Патофизиология и экспериментальная терапия, 2, 3, 31, 1958.
8. Олейник С. Ф. и Панчишина М. В. Вопросы онкологии, XIV, 8, 53, 1968.
9. Iglewsky B. H. and Ludwig E. H. Cancer Res. 27, 1, 179, 1967.
10. Iglewsky B. H. and Ludwig E. N. Cancer Res. 27, 1, 185, 1967.
11. Freund E., Kaminer G. Bioch. Ztsch. 26, 312, 1910.
12. Hirada J. and Kubo S. J. Antibiotics, 9, 160, 1956.
13. Schrek R. Am. J. Cancer, 28, 389, 1936.