

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

Р. Г. МКРТЧЯН

ВЛИЯНИЕ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ КЛЕТОЧНОЙ СУСПЕНЗИИ
СЕЛЕЗЕНКИ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ МЫШЕЙ
ПРИ ЛУЧЕВЫХ ПОРАЖЕНИЯХ

Необычная сложность лучевой болезни у высших животных обусловлена тем, что поражение охватывает в той или иной мере все системы органов и тканей. По своей радиочувствительности одно из первых мест занимает кроветворная система, в которой под действием радиации наступают отчетливо выраженные ранние нарушения приводящие к гибели млекопитающих после облучения.

В последнее время считают, что тотальное облучение убивает животных по одному из трех общих механизмов: в результате повреждения кроветворной системы (в основном костного мозга), желудочно-кишечного тракта, центральной нервной системы или, что часто встречается, от комбинации этих нарушений.

Было замечено, что экранирование селезенки, печени и костного мозга резко снижает смертность (Bloom [8], Jacobson, Marks' [14] и др.). Это навело на мысль применять органотерапию с целью возмещения или стимуляции кроветворных органов при лечении лучевой болезни. В опытах, поставленных Линдслеем (Lindsley [12]), Макиноданом (Makinodan [13]) и их сотрудниками, установлено, что введенные клетки, приживаясь, размножаются в организме облученного реципиента и что вновь формирующиеся клетки красной крови имеют такой же тип, как и у донора. Аналогичные результаты были получены и для других форменных элементов крови-гранулоцитов, пластинок (Smith [16], Nowell). В 1954 г. Барнс и Лутит поставили опыты по применению гетерологических, но гомоспецифических селезенки мышей. Селезенка мышей линии А, введенная мышам линии СВА, дала значительное выживание (9 из 16) к 30-му дню, но в течение последующих 100 дней все мыши погибли. При введении же гомологичной селезенки средняя продолжительность жизни мышей, переживших 30 дней, составляла 500 дней.

При лечении лучевой болезни костным мозгом или клеточной суспензией селезенки наиболее эффективной оказалась внутривенная инъекция. По данным этих авторов внутрибрюшная и внутригрудная инъекции менее эффективны. Никакого эффекта не дают внутримышечные и подкожные инъекции. При свободной гемопластической пересадке костного мозга и селезенки И. Н. Караваев, В. А. Ревис и М. Я. Шлейфер

[1] наблюдали инкапсулирование трансплантата и отсутствие эффекта выживания. Большинство вышеуказанных авторов объясняет механизм действия этих клеток существованием в селезенке и костном мозге «восстанавливающего фактора», введение которого животным, облученным летальными дозами рентгеновых и гамма лучей, приводит к выживанию. Оказалось даже возможным продолжительное хранение костномозговых и других кроветворных тканей (Billen [5]). Эти данные показывают, что «восстанавливающий фактор» является устойчивым образованием. Якобсон и другие, работающие в этой области, считают, что этот фактор представляет собой химическое вещество или гормон. Данные, полученные Барнсом (Barnes), Лутитом (Loutit), Колем (Cole) и Эллисом (Ellis), не позволяют исключить возможность, что действующим началом является перенос животных клеток, которые в течение некоторого времени действуют, как пересадка ткани.

Костно-мозговая терапия и лечение клеточной суспензией селезенки оказывают лечебное действие при облучении рентгеновыми и гамма лучами (Logenz [11]). Проводились попытки использования костно-мозговой терапии после внутривенного введения летальных доз радона. Рендольф и сотрудники указывают на эффективность костно-мозговой терапии и после тотального облучения нейтронами в 14 Мэв. Как видно, затронутые вопросы изучаются весьма интенсивно и детально. Однако полученные авторами результаты довольно разноречивы, а порой и сомнительны, что, по-видимому, можно объяснить тем, что они получены при разных методах исследования и условиях эксперимента (доза облучения, вид животных, источники облучения) и, самое главное, в разные сроки после облучения.

Была сделана попытка лечить лучевую болезнь органотерапией (применением гетерогенной клеточной суспензии селезенки необлученных животных) и найти наиболее эффективные сроки введения этих суспензий после облучения.

Материал и методика работы. Опыты проводились на белых мышах-самцах 3—4-месячного возраста, весом 16—18 г. Донорами являлись новорожденные мыши и крысята 5—6-дневного возраста. Проведение экспериментов на мышах диктовалось необходимостью минимальных затрат клеточной суспензии для получения эффекта выживания.

Использованные в опыте животные-реципиенты подвергались однократному общему облучению γ -лучами на установке ГУБЭ-800 в камерах из плексигласа, по 10 штук одновременно. Мощность дозы составляла 360 р/мин. Общая доза, полученная животными, составляла: для первой серии опытов 700, для второй серии 900 р.

Клеточные суспензии приготавливались из селезенок 5—6-дневных крысят. Они забивались декапитацией; извлекалась селезенка, освобождалась от капсулы и промывалась в растворе Локка. С помощью острых ножниц селезенка разрезалась на мелкие кусочки, вновь промывалась раствором Локка и осторожно продавливалась шприцем через толстую иглу. Затем полученная суспензия еще три раза

продавливалась через иглу более тонкого диаметра. Для введения использовалась суспензия, состоящая из клеток, свободно проходивших через иглу № 26. Центрифугирование суспензии не дало заметного различия. Подсчет числа клеток производился в камере Горяева с пересчетом на 1 мл суспензии. После облучения часть животных, для контроля, оставляли на выживаемость, а остальным животным в разные сроки (спустя 2 и 24 ч., 3 и 5 дней после облучения) внутрибрюшинно вводили клеточную суспензию селезенки из расчета $1,8 \cdot 10^6$ — $2 \cdot 10^6$ клеток в 0,6 мл раствора Локка на одну мышь. За выживаемостью наблюдали в течение 30 дней.

Полученные результаты и их обсуждение. В первой серии опытов мышей облучали при дозе 700 р. 30 мышей оставляли на выживаемость—контроль, остальным в указанные сроки вводили клеточную суспензию. Для каждого срока введения суспензии брали не менее 30 мышей. Тестом для определения тяжести развивающейся лучевой болезни служили внешний вид животного, подвижность, потеря в весе, состояние покрова шерсти, аппетит, характер испражнений и т. д. На рис. 1 показана зависимость выживаемости от сроков введения суспензии при дозе облучения 700 рентген.

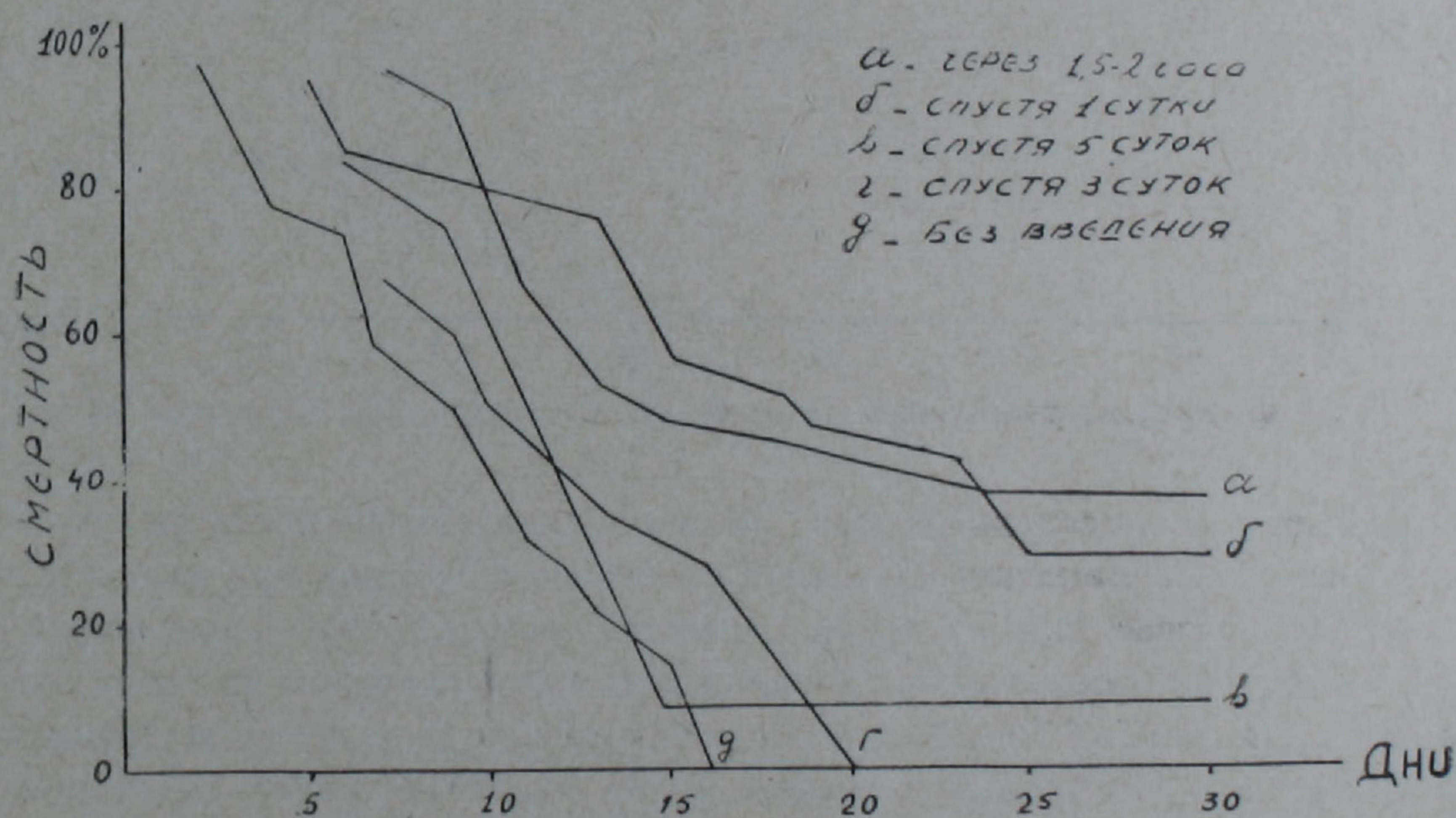


Рис. 1. Выживаемость и сроки введения суспензии при дозе облучения 700 р.

Как видно из рисунка, контрольные животные все погибают к 17 дню. Наиболее массовая гибель при этом отмечается на 3, 4, 7, 9, 11, 13 дни после облучения. Уже на 2—3-й день после облучения животные перестают чиститься, мало двигаются, отказываются от пищи, появляется жажда и признаки расстройства желудочно-кишечного тракта. Со временем эти явления усиливаются, животные катастрофически теряют вес, появляется адинамия и кровотечение. Животные, которым через 1,5—2 ч. после облучения была введена суспензия, гибнут, начиная с 6-го дня с максимально выраженным пиком на 13—15 дни. В этой серии опытов,

как видно из графика, выживаемость составляет 28,6%. При введении клеточной суспензии через сутки после облучения первые сроки гибели животных сдвигаются на 7—9 дни, далее мыши гибнут на 11, 13, 15 дни. Именно в эти дни отмечается наиболее массовая гибель мышей. Общий ход развития лучевой болезни в этом случае замедлен, 30-дневная выживаемость наибольшая и составляет 37%. Введение суспензии через трое суток менее эффективно—выживаемость составляет всего 8,4%. Животные начинают гибнуть с 6-го дня и затем на 13—15 дни. Введение суспензии через 5 суток после облучения не дает 30-дневного эффекта—выживаемости, но все животные погибают лишь к 20-му дню, тогда как в контрольной группе 100% смертность наступает на 16—17 дни.

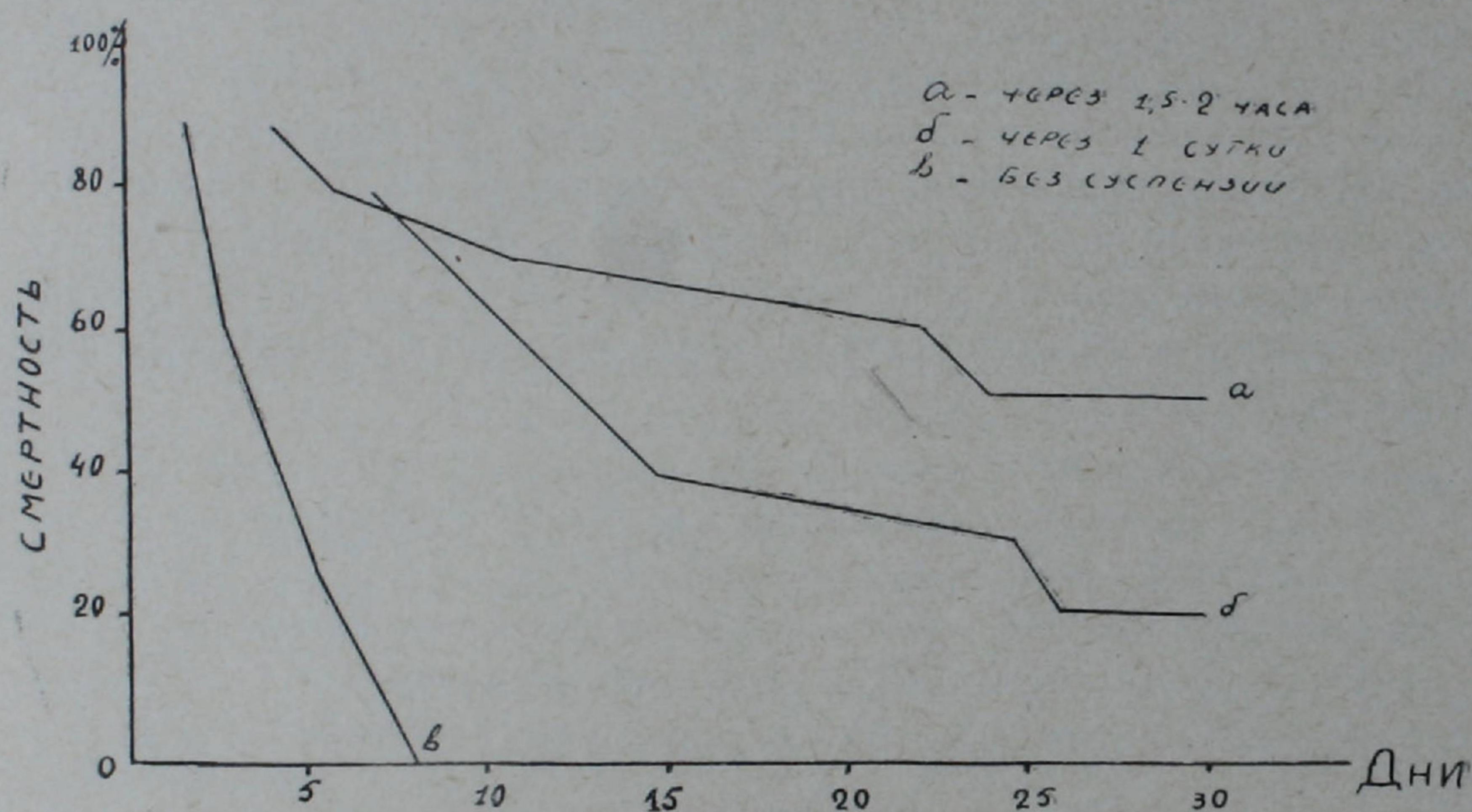


Рис. 2. Выживаемость и сроки введения суспензии при дозе облучения 900 р.

На рис. 2 приведены кривые, показывающие зависимость выживаемости от сроков введения клеточной суспензии селезенки при дозе облучения 900 рентген. При введении суспензии через 1,5—2 ч. после облучения выжило 50% подопытных животных. В этом случае мыши гибли, начиная с 4-го дня, на 22—24 дни после облучения. В то же время кривая выживаемости контрольных мышей круто падает, начиная со второго дня и доходит до нуля уже на 8-й день после облучения. При введении суспензии, спустя сутки после облучения, гибель мышей начиналась с 7-го дня и к 30-му дню выживало 20% животных.

На рис. 3 отражена зависимость между выживаемостью и дозой облучения при введении клеточной суспензии селезенки через 1—2 ч. после облучения. Наибольшая выживаемость получилась при дозе облучения 900 р. При дозе 700 р выживаемость значительно меньше—28,6%.

Для более позднего срока введения суспензии (спустя сутки) зависимость выживаемости от дозы облучения представлена на рис. 4. Введение суспензии спустя сутки оказывается более эффективным при меньшей дозе. Для 700 р выживаемость составляет 37%, для 900 р—20%.

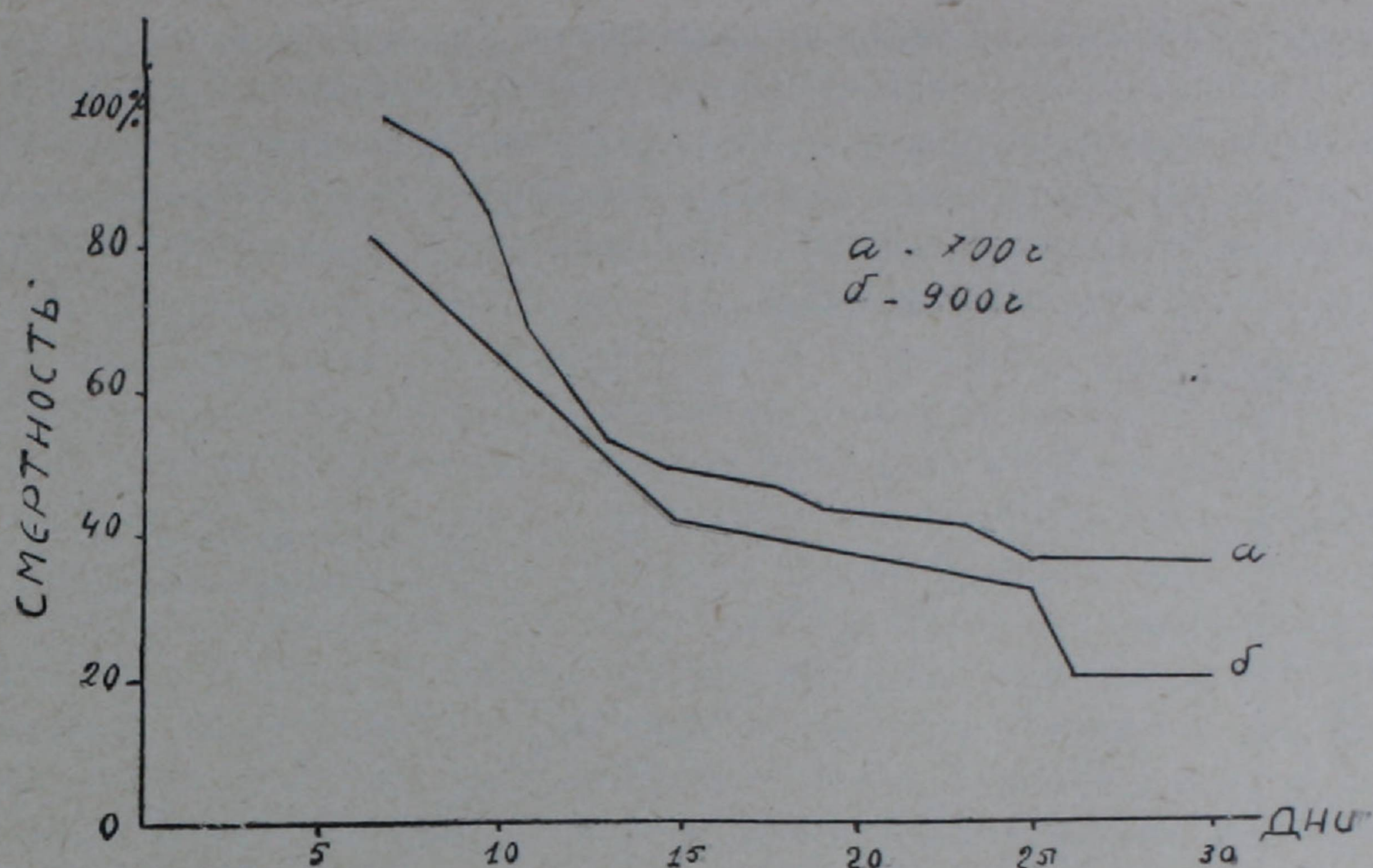


Рис. 3. Зависимость между выживаемостью и дозой при введении суспензии через 1,5—2 ч. после облучения.

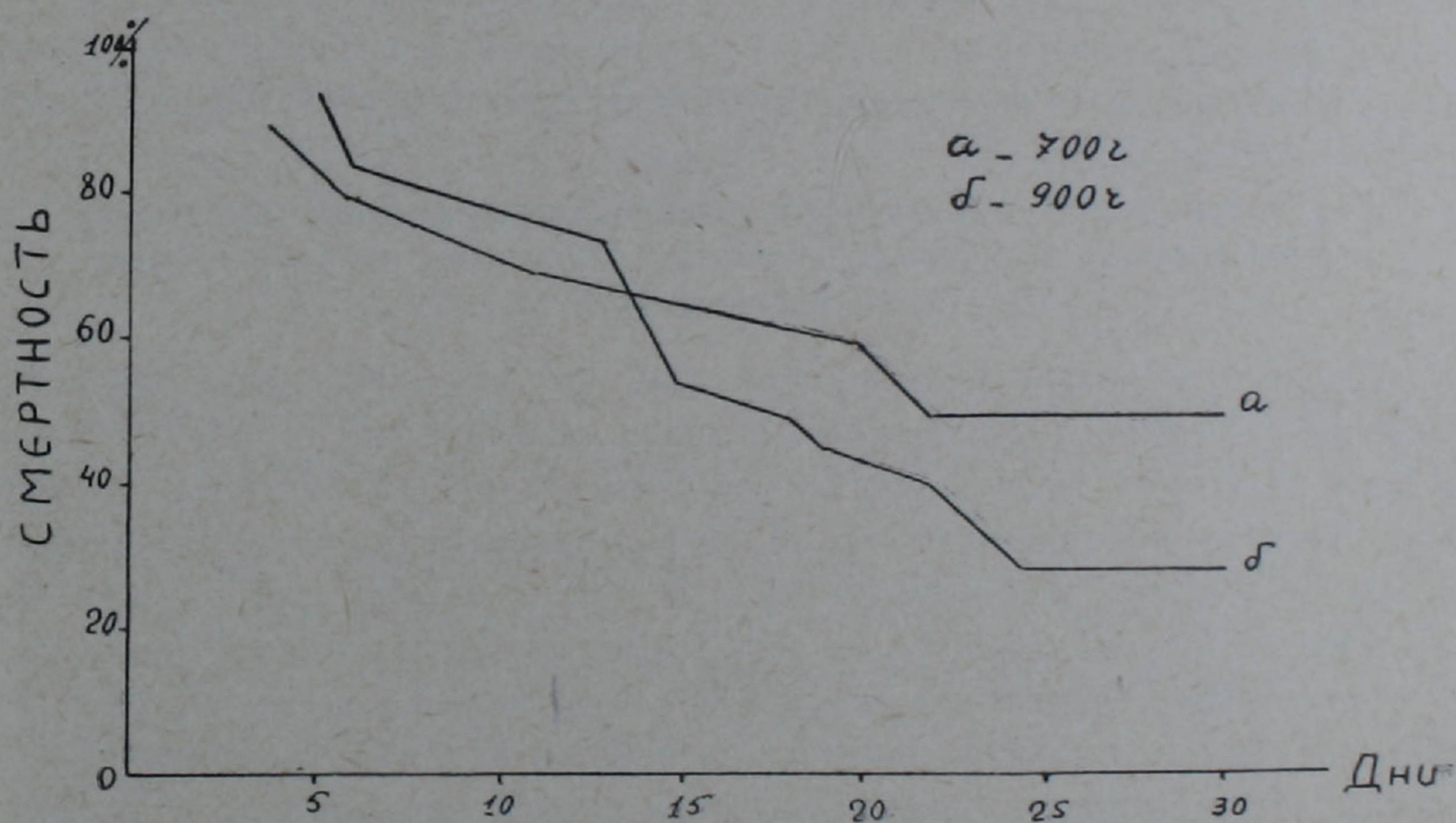


Рис. 4. Зависимость между выживаемостью и дозой при введении суспензии спустя сутки после облучения.

Очевидно при дозе облучения 700 p через сутки в организме животных наступают не столь значительные изменения, как при дозе облучения в 900 p, и потому восстановление бывает более полным. К тому же на второй день после облучения при дозе 700 p подавленные радиацией иммунобиологические реакции угнетаются еще сильнее, и реакция антиген-антитело, которой интактный организм отвечает на введение чужеродного белка, не протекает и не осложняет развития и течения лучевой болезни.

В последней серии опытов была сделана попытка установить зави-

симось выживания от введения изологичной (мышиней) и гетерологичной (крысиной) клеточной суспензии селезенки, введенной через 1,5—2 ч. после облучения при дозе 700 р. Полученные результаты показаны на рис. 5. Как видно, несколько больший эффект получается при введении изологичной селезенки—29%. При введении гетерологичной селезенки выживаемость составляет 25%.

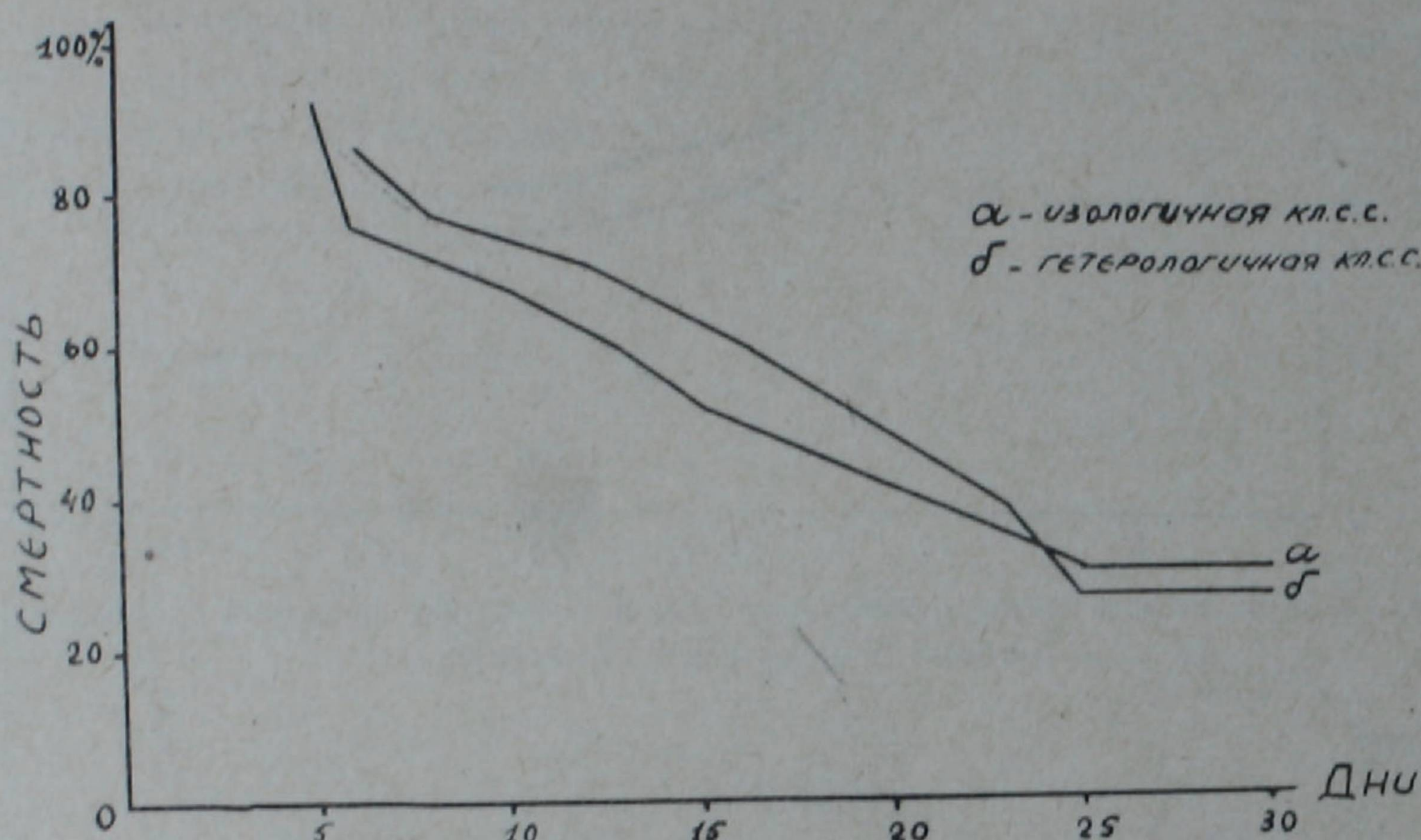


Рис. 5. Зависимость выживаемости от введения изологичной, (мышиней) и гетерологичной (крысиной) клеточной суспензии, введенной через 1,5—2 ч. после облучения при дозе 700 р.

Полученные нами данные показали, что внутрибрюшное введение клеточной суспензии селезенки оказывает несомненный терапевтический эффект. В опытах, проведенных Якобсоном, Марксом, Гастоном (Gaston [14]), Лутитом и Барнсом [6—7], И. Н. Караваевым [1], А. С. Шавелевым [3], выживаемость доходила до 70%. В наших опытах наибольшая выживаемость составляла 50%. Расхождение результатов, вероятно, объясняется разным количеством вводимых клеток и, что важнее, методом их введения (вышеуказанные авторы суспензию вводили внутривенно). В перечисленных работах число вводимых клеток варьировало от $0,5 \cdot 10^6$ до $10 \cdot 10^6$ клеток на одну инъекцию. В наших опытах вводилось $2 \cdot 10^6$ клеток.

В наших опытах использовались крысы, однако введение им внутрибрюшинно двух миллионов клеток селезенки не давало никакого терапевтического эффекта. Таким образом, если предположить, что количество вводимых клеток для получения эффекта должно увеличиться соответственно увеличению веса реципиента, то факт отсутствия терапевтического эффекта у крыс, а также причину различий литературных и наших данных легко объяснить. Барнс и Лутит считают, что действующим началом при введении клеток селезенки является перенос животных клеток, которые в течение некоторого времени действуют, как пере-

садка ткани. Но это не исключает возможности общей биостимуляции обменных процессов в организме.

Якобсон, Маркс и др. [14] указывают, что наибольший эффект выживания достигается при немедленном введении клеточной суспензии после облучения. В наших опытах получено, что при дозе облучения 700 р наибольшая выживаемость следует при введении суспензии через сутки после облучения, для 900 р—через 1,5—2 ч. Вероятно, эффективность клеточной суспензии селезенки зависит не только от сроков ее введения, но и от степени подавления иммунобиологических реакций облученных организмов. Н. Н. Клемпарская [2] считает, что полное угнетение иммунологических реакций у крыс при дозе облучения 600 р наступает на 2—3 сутки. Следовательно, есть основание считать, что в условиях наших опытов—через 1,5—2 ч. после облучения при дозе 700 р—не должно наблюдаться значительного подавления способности организма вырабатывать антитела на введенные антигены—клетки. Таким образом, на ход лучевой болезни накладывается остаточная реакция антиген-антитело, что приводит к гибели животных. Через сутки после облучения эта реакция организма значительно подавляется или же отсутствует, вследствие чего выживаемость увеличивается. При сравнении терапевтического эффекта изологичной и гетерологичной суспензии в наших опытах получено незначительное увеличение выживаемости при введении изологичной суспензии. Аналогичные результаты получены в работе Ван-Беккума (Van-Bekkum) и Де Грута (De Groot) [15].

В ы в о д ы

1. Внутривентральное введение клеточной суспензии селезенки необлученных 5—6-дневных крысят повышает выживаемость облученных животных.

2. Величина терапевтического действия введенной суспензии зависит от дозы облучения и сроков ее введения после облучения; максимальный эффект при облучении животных дозой 700 р наблюдается при введении суспензии через сутки, а при дозе 900 р—через 1,5—2 ч. после облучения.

3. При введении клеточной суспензии в отдаленные сроки после облучения наблюдается соответственное уменьшение терапевтического действия, вплоть до его полного исчезновения на 5-е сутки после облучения.

4. Сравнительно большой терапевтический эффект наблюдается при введении клеточной суспензии селезенки изологичных животных.

Сектор радиобиологии

АН АрмССР

Кафедра биофизики

Московского государственного университета

Поступило 23.I 1961 г.

Ռ. Գ. ՄԿՐՏՉՅԱՆ

ՓԱՅԾԱՂԻ ՀԵՏԵՐՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ԲՋՋԱՅԻՆ ՍՈՒՍՊԵՆԶԻԱՅԻ
ԱԶԴԵՅՈՒԹՅՈՒՆՆԸ ՄԿՆԵՐԻ ԱՊՐԵԼԻՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ՝ ՃԱՌԱԳԱՅԹԱՅԻՆ
ԱԽՏԱՀԱՐՄԱՆ ԴԵՊՔՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ներկա աշխատության նպատակն է ճառագայթային հիվանդությունը բուժել չճառագայթված նորածին կենդանիների փայծաղից պատրաստված բջջային սուսպենզիայով, հետևել ապրելիությանը՝ կախված ներարկման ժամկետից, ճառագայթման դոզայից և ներարկման ճանապարհից: Մինչև այժմ այս տիպի աշխատություններում ընդունված է սուսպենզիայի ներերակային ներարկումը, այլ ուղիների խիստ թույլ էֆեկտիվության պատճառաբանությամբ:

Մեր աշխատանքների ընթացքում փորձի ենթակա սպիտակ մկները ճառագայթման են ենթարկվել 700 և 900 ռենտգեն-դոզաներով: Ճառագայթումից հետո, տարբեր ժամկետներում, մկները ներորովայնային ստացել են չճառագայթված 5—6 օրական առնետների փայծաղից պատրաստված բջջային սուսպենզիան, որը պարունակել է 1,5—2 միլիոն անվնաս բջիջներ:

Ստացված արդյունքները ցույց են տվել, որ՝

ա) չճառագայթված նորածին առնետների փայծաղից պատրաստված բջջային սուսպենզիայի ներորովայնային ներարկումն զգալիորեն բարձրացնում է ճառագայթված կենդանիների ապրելիությունը:

բ) ներարկված սուսպենզիայի թերապևտիկ էֆեկտիվությունը կախված է ճառագայթման դոզայից և ներարկման ժամկետից: 700 ռենտգեն-դոզայի դեպքում մաքսիմալ արդյունք ստացվում է, եթե ներարկումը կատարվում է ճառագայթումից մեկ օր անց, իսկ 900 ռենտգեն-դոզայի դեպքում՝ 1,5—2 ժամ հետո:

գ) ավելի ուշ ժամկետներում, ներարկման էֆեկտիվությունը համապատասխանորեն նվազում է, ընդհուպ մինչև լրիվ անհետացումը, ճառագայթումից 5—7 օր անց:

դ) իզոլոգիկ և հետերոլոգիկ ծագում ունեցող կենդանիների փայծաղներից պատրաստված բջջային սուսպենզիաների ներակումից ստացված տվյալները խոսում են առաջինի համեմատաբար բարձր էֆեկտիվության օգտին:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Караваев И. Н., Ревис В. А., Шлейфер М. Я. Лечение острой лучевой болезни методом трансплатации костного мозга и селезенки в эксперименте. Врачебное дело, 1959, I.
2. Клемпарская Н. Н., Петров Р. В. Инфекция и иммунитет у облученных животных. Сб. „Радиационная медицина“, 1960.
3. Шевелев А. С. Радиационные химеры и лечение лучевых поражений. Природа, 1960, 3.

4. Шлейфер М. Я. К вопросу о лечении острой лучевой болезни гомопластической пересадкой селезенки. „Патологическая физиология и экспериментальная терапия“, 1960, 1
5. Billen D., Ferrebee J. W., Urso I. M. Preservation of radiation recovery factor in frozen marrow. Blood, 1957, 12, 1096.
6. Barnes' D. W. H., Loutit J. F. Proc. R. Soc. Med. 1953, 46, 251.
7. Barnes' D. W. H., Loutit J. F. What is the recovery factor in spleen? Nucleonics, 1954, 12, 5, 68.
8. Bloom. Histopathology of irradiation from external and internal sources, «Bone marrow», 1950.
9. Cole I. J., Garver R. M., Ellis M. E. Transfer of donor immunological reactivity to X-irradiated F. hybrid mice by injected parental bone marrow. Amer. J. Physiol. 1959, 196, 1, 100.
10. Congton C. C. Bone marrow transplantation in animal exposed to wholebody radiation. J. Cellular and Compar. Physiol. 1957, 50, suppl, 1, 103—108.
11. Lorenz E., Congton C. C. Congr. Intern. Cos. Hematology, 1954, p. 192.
12. Ltndsby D. Z., Odell T. T., Taushe F. G. Splantation of functional erythropoetic elements folloving total-body irradiation. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1956, 90, 912.
13. Makinodan T. Immunology of bone marrow transplantation. J. Cellular Comp. Physiol., 1957, 50, Suppl. 1 : 327.
14. Jacobson L. O., Marks E. K., Gaston E. O., Robson M. I. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1949, 70, 740.
15. Van-Bekkum D. W., De Groot J. Progress in Radiobiology. Edinburgh, 1956, p. 243.
16. Smith W. W. Am. J. Physiol. 1955, 183, 98.