

## Значение метода тканевых культур *in vitro* (т. н. эксплантации) для рентгенобиологии и рентгено-терапии.

Пр.-доц. Р. Я. Гасуля.

### I.

Когда мы приступаем к оценке какого-нибудь терапевтического средства, нам необходимо прежде всего изучить *непосредственное* действие его на физиологические или патологические процессы в организме, органах и тканях. В рентгенотерапии эта оценка ранее была затруднена тем, что мы не имели еще достаточных биологических данных, на основании которых могли бы говорить о непосредственном действии рентгеновских лучей на органы и их функции. Лишь недавно отдельные экспериментаторы прибегли для разрешения этого вопроса к *методике тканевых культур в эксплантате*. Таковы первые работы Prime'a и Wood'a (1920), Strangeways'a (1924), Р. Я. Гасуля (1924-25), Roffo (1925), А. А. Кронтовского (1925), Sittenfield'a (1926) и Schubert'a (1927).

Когда мы подвергаем освещению какой-нибудь орган в *организме*,— скажем селезенку,—то конечный эффект освещения будет складываться из целого ряда интегрирующих моментов, а именно, из результата освещения: кожи, подкожной клетчатки, жирового слоя, части кишек, желудка, ребер, нервов, сосудов и лимфатических узлов. Освещая кожу, мы подвергаем действию лучей и глубже лежащие органы. Мы поэтому в редких случаях имеем право говорить об освещении *органа*, если мы его действительно не изолировали топографически, или же, напр., по способу Кравкова. Что же касается освещения *ткани*, то это становится возможным лишь при выделении ее из комплекса других тканей и связи ее с телом, т. е. в *тканевой культуре in vitro*.

Вот почему изучение действия лучей на ткани в эксплантате и на изолированные органы является единственным методом точного анализа *непосредственного* биологического эффекта освещения основных элементов всего живого—протоплазмы и ядра клетки.

На эту роль методики эксплантации в экспериментальной радиобиологии мне пришлось указать впервые в 1923 г. на I Всесоюзном Съезде Патологов и на II Всесоюзном Съезде Рентгенологов в Ленинграде: „В объективном изучении *непосредственного* действия лучей на *ядро* и *протоплазму* клетки, в исследовании *функциональных* и *морфологических* изменений в тканевых комплексах под влиянием освещений, в определении роли *среды* и *субстрата* тканей—скрыта разгадка тайн эффекта освещения“.

## II.

Еще до применения методики эксплантации в радиобиологии мы имели, начиная с классических работ О. Hertwig'a над радиированными яйцевыми клетками, огромное число экспериментов и наблюдений, которые и до сих пор лежат в основе всей рентгенотерапии. Методика тканевых культур с одной стороны способствовала более детальному анализу отдельных факторов влияния лучистой энергии, с другой — породила целый ряд новых проблем.

Несмотря на то, что методика эксплантации датируется с 1884 г. — после того, как W. Roux<sup>1)</sup> впервые перешел от наблюдения *переживающих* тканей к исследованию *живущих* тканей вне тела в особой питательной среде, где клетки росли и развивались, — и затем, благодаря работам Vogt'a, главным же образом Harrison'a (1907), Burrows'a и Carrel'a, Ebeling'a и Loeb'a, заняла выдающееся место в радиобиологии при изучении морфологии и физиологии клеток, — она лишь выше перечисленными девятью авторами была применена в радиобиологии.

Здесь не место описанию этой методики. Техника эксплантаций подробно изложена в специальных работах<sup>2)</sup> и состоит в том, что при помощи особых манипуляций микроскопически-малый кусочек ткани при соблюдении правил абсолютной асептики помещается в особых камерах в каплю *плазмы* крови с примесью (или без нее) экстрактов. Наблюдения производятся при помощи микроскопа.

Следует тут же заметить, что все выводы, сделанные после изучения жизни эксплантатов, должны рассматриваться с точки зрения тех особенных условий, при которых живет и развивается *изолированная* от остального организма ткань, которая в этой *vita propria* (Hertwig) не всегда дает картину нормального роста и развития ее в организме. Ткань вне организма в процессе роста может потерять или приобрести некоторые свойства (Erdmann, Champy, Гасуль). Это, однако, не мешало производить тщательные наблюдения над малейшими изменениями в тканях под влиянием лучей, пролившими свет на многие спорные вопросы в радиобиологии.

## III.

Пользуясь методикой эксплантации, мы имеем техническую реальную возможность производить любой аппаратурой *непосредственные* освещения рентгеновскими (или другими) лучами *произвольно* выбранную ткань, или клеточную группу, или даже *одну* клетку, и наблюдать под микроскопом *любую фазу реализации эффекта* освещения. Преимущество этой методики пред обычным гистологическим анализом налицо: в то время, как при гистологическом исследовании мы улавливали одну какую-нибудь фазу в изменении клеток и тканей, которые, кроме того, еще до микроскопического исследования *умерщвлялись* разными

<sup>1)</sup> Самое слово „эксплантат“ принадлежит этому выдающемуся биологу.

<sup>2)</sup> См. R. Erdmann. *Praktikum der Gewebepflege*. Verl. Springer. 1922.—А. А. Кронтовский. *Методика тканевых культур*. Киев. 1917.—Р. Я. Гасуль. *Regeneration, Transplantation und Explantation*. *Exper. Studien. Archiv f. Entwicklungsmech.* Bd. 97, 1923.—Р. Я. Гасуль. *Вестник рентгенологии*, т. IV, вып. 3.

фиксаторами и красками, мы в эксплантате наблюдаем изменения над *живой* клеткой и фиксируем все фазы ее развития помощью рисовального прибора или микрофотографического аппарата, лишь затем, если нужно, надолго фиксируя ее обычными способами.

В области эмбриологии, гистологии и онкологии эксплантационная методика дала чрезвычайно богатые результаты. Работы Carrel'a, Volpino, Thomson'a, Lambert'a и Hanes'a, Ebeling'a, Champy, Venati, Uhlenhuth'a, Erdmann'a, Максимова, Хлопина, Тимофеевского, Кронтовского, Гасуля и др. показали, что в эксплантате можно было проследить гэматопоез, инволюцию разных клеточных элементов крови, метастазирование саркоматозных клеток, процесс витального окрашивания,—все это, так сказать, на глазах наблюдателя. Иммунология опухолей обогатилась наблюдениями в области имплантации опухолей: у предварительно иммунизированных животных имплантированные клетки не в состоянии выделить шптры для своего развития, и эксплантации в плазме таких животных не удаются. Дальнейшие работы показали, что, хотя изолированные клетки быстрее растут, но лишь в *присутствии других таких же клеток* (Ebeling), присутствие же другой ткани, напр., соединительной в эксплантатах эпителия, задерживает рост последнего (Champy). В лимфе из лимфатических мешков у лягушки удалось обнаружить усиленный рост соединительной ткани подкожного слоя (Гасуль, 1920).

Особое освещение получили эти данные в связи с выдвинутым в 1924 г. Carrel'em учением о *трефонах*, т. е. о таких питательных веществах, которые содержатся в одних клетках для питания других клеточных комплексов, как, напр., найденные трефоны лимфоцитов—для питания соединительнотканых элементов. Среда и субстрат, оказалось далее, играют большую роль в *дифференциации* эксплантированной клетки: нормальные эпителиальные клетки, посаженные в гетерогенную среду, приобретали гетерогенные свойства и не имплантировались (Гасуль, 1920), и обратно—гетерогенная ткань, посаженная в гомологическую среду, поддавалась гомопластике (Erdmann, 1921).

#### IV.

Мною уже было указано, что число экспериментальных работ, произведенных с помощью методики эксплантации в области изучения действия лучистой энергии, очень невелико. В самых солидных учебниках и руководствах мы редко встречаем даже краткое изложение результатов подобных исследований. Попытаемся заполнить этот пробел.

Первые освещения рентгеновскими и радиевыми лучами *патологических* тканей были произведены Prim'ом и Wood'ом (1920), которые взяли для своих опытов экстирпированные кусочки саркоматозной и раковой ткани у мышей и эмбриональные ткани у курицы, посаженные в сыворотку или плазму крови. Целью их было определение летальной дозы лучей. Опыты показали, что после освещения дозой в 4 кожных эритемных единицы (4 HED) через 3 мм. алюминиевого фильтра погибали эмбриональные клетки, а после 4—5 HED—опухолевые клетки. При освещении давших рост опухолевых имплантатов в теле хозяина дозы повышались.

Эти опыты были в целом подтверждены Strangeways'ом (1924), который, однако, более углубился в цитоморфологию изменений после

освещений. Он также экспериментировал над эксплантатами из эмбриональных тканей курицы, причем уже после слабых доз ему удалось обнаружить заметную задержку процесса деления клеток. Клетки, которые уже начали делиться, обнаруживали замедление фаз деления. Т. н. раздражающего действия лучей *Strangeways* не мог констатировать. Точно также длина волны лучей не играла существенной роли в его опытах.

В опытах Roffo (1925) эксплантаты *in vitro* из сердечной ткани 9-дневных куриных эмбрионов погибали при дозах в 3—4 раза больших, чем те, которые вызывали подобный же эффект в тканях *in vivo*. В последнем случае задержка роста эксплантатов наступала спустя 24—48 часов после освещения. Roffo считает действие лучей на *среду* важным интегрирующим фактором.

Опыты над эмбриональными тканями имели, однако, тот недостаток, что включали в себе кроме  $x'$  (ткань под влиянием лучей) еще  $y$  (мотор усиленного роста эмбриональной ткани под влиянием лучей). Для анализа действия лучей на патологические ткани необходимо было исследовать их влияние на *нормальные ткани взрослого* индивида.

Первые опыты в этом направлении были поставлены мною в 1924—25 г.г. над тканями взрослой лягушки (*Rana temporaria*). В предварительной серии опытов удалось обнаружить явное влияние *дневного света* на ткани таких органов, которые в норме пребывают в темноте: *селезенку* и *мерцательный эпителий* из зева лягушки. *Лимфоциты* и *лейкоциты* *медленнее* двигались и *дольше* жили в эксплантатах, оставленных в темноте; *витальное* окрашивание эксплантатов (в *плазме* витально окрашенной лягушки) наступало скорее в эксплантатах, выставленных, как обыкновенно это делается с культурами тканей холоднокровных, на свет при комнатной температуре. Действие же *рентгеновских* лучей было прослежено на трех больших экспериментальных сериях. При освещении *мерцательного* эпителия *движение ресничек*, измеренное на особо препарированных *вращающихся* вокруг своей оси круглых кистообразных конгломератах, после кратковременного ускорения (у молодых эксплантатов) обыкновенно скоро *прекращалось*. Параллельно шла кривая *редукционной* способности освещенных тканей (реактивом служил раствор метиленовой синьки по Drew-Wasserman'у). Закон Arndt-Schulz'a при этом не мог быть прослежен.

При *морфологическом* исследовании удалось обнаружить нарастающие в зависимости от дозы (от 40% до 300% НED) *деструктивные* изменения в *протоплазме* и *ядре* клеток. Было отмечено некоторое *различие* в действии лучей *разной длины волны*. При освещении *ядерных эритроцитов* лягушки в эксплантате *нефильтрованными* (мягкими) лучами *деформировалась* *протоплазма*, *ядро мигрировало* в периферию, и наступал *гэмолиз*. При освещении жесткими лучами (через фильтры) деструктивные изменения были более выражены в *ядре* (пикноз, кариолиз). *Молодые* клетки при этом оказывались несколько более устойчивыми, чем старые, что особенно было выражено при *витальном* окрашивании их кармином: старые клетки быстрее молодых нагружались окрашенными кармином зернышками. Наконец, эксплантаты, посаженные в *плазму* предварительно *рентгенизированной* лягушки, выявляли очень *плохой* рост и очень быстро *аутолизировались*.

На основании наших данных мы приходим к следующим выводам:

1) Действие рентгеновских лучей *неспецифично*, ибо некоторые старые

культуры проявляли те же изменения, как и долго освещенные. 2) Лучи действуют *непосредственно* на ядро и *протоплазму* клетки, вместе со включениями — митохондриями, которые очень чувствительны к лучам (Вайль, Френкель, Надсон, Рахлина-Глейхгевихт, Ясвоин). 3) Живая ткань реагирует на освещение по закону *регенерации*, т. е. восстановления нарушенного, потерянного. 4) Эта регенерация наступает лишь в том случае, если повреждение не перешагнуло определенного предела. 5) Повышенная энергии, потраченная на регенерацию, вычитается из общего количества потенциальной энергии данного живого объекта, — ускорение, напр, мерцания эпителия шло в ущерб продолжительности; другие клеточные элементы скорее отживали.

М. Неменов, опираясь на данные Child'a и Pütter'a, думает, что освещенные клетки скорее стареют. Молодые клетки не так легко диссоциируются. Коротковолновые (жесткие) лучи меньше повреждают мембрану клеток, чем длинноволновые (мягкие) лучи.

Как удалось установить Надсону, при *ионизации* протоплазмы происходит *расщепление* ее на *дисперсные белки* и *липиды*. Белки *денатурируются*, из *эмульсионного* переходят в *суспензионное* состояние и *дегидрируются*. Наступает *вакуолизация*, коагуляция; зернистость увеличивается вместе с *увеличением проницаемости* протоплазмы.

Эксперимент Roffo (l. c.) нашел более детальную и систематическую обработку в работах А. А. Кронтовского (1925), который освещал одинаковыми дозами эксплантаты из тканей куриных *эмбрионов* и из *селезенки взрослых* кроликов и нашел, что эмбриональные эксплантаты оказались *более стойкими*, чем ткань селезенки кролика. Последняя проявляла очень замедленный рост в то время, как первые после освещений оставались неизменными; мезенхимальная ткань, экто — или энтодерма росли одинаково хорошо. Совершенно другую картину Кронтовский получил, освещая эмбрионы *in vivo* в яйцевой оболочке: тут эмбрионы через день *умирали* от гораздо меньших доз. Когда же он тотчас после освещения эксплантировал ткани эмбрионов, последние в росте не отличались от неосвещенных.

Выводы, к которым приходит Кронтовский, следующие: „Хотя при действии рентгеновских лучей на зародыши все эмбриональные ткани одновременно и подвергаются действию рентгеновских лучей, однако из факта быстрой гибели при этом зародыша нельзя делать вывод о том, что эта доза лучей непосредственно губительна и вообще для эмбриональных тканей“.

В этих опытах мы, т. о. находим два момента: первичное непосредственное воздействие лучей и вторичную фазу реализации этого инсульта. Последняя оказалась чрезвычайно важной при освещении тканей *in vivo* в организме.

Из других работ в данной области упомянем об одной работе Sittenfield'a, который освещал радиоактивными веществами эмбриональное сердце и селезенку курицы и нашел задержку роста в эксплантате, и, наконец, о недавно появившихся работах Dustin'a и M. Schubert'a.

Schubert исходил из тех проблем, которые затронули Кронтовский и др. Подтвердив данные Кронтовского и многие данные

Гасуля, этот автор пошел дальше в изучении первичного лучистого эффекта и роли вторичной реакции в организме. Особое внимание им было обращено на время наступления первых реакций на освещение. В ткани сердца зародыша, эксплантированной через 2 часа после его освещения, наблюдалось угнетение роста, через 3 часа—полное прекращение последнего. Освещение среды—эмбрионального экстракта—вызывало также угнетающее действие на рост тканей. На основании своих опытов Schubert пришел к следующим выводам, которые во многом сходятся с нашими:

Изменения в клетках не являются специфичными для рентгеновских лучей. Вызванное лучами повреждение мембраны играет большую роль в деструктивном эффекте освещения. Рентгеновские лучи действуют первично на клетки. Продукты распада (некрогормоны в духе Caspary) усиливают и довершают это действие. Общие рентгеновские реакции объясняются действием продуктов распада; однако, сравнивать действие лучей с парентеральным введением белка нельзя в том виде, как это делают некоторые авторы,—продукты распада в том и другом случае не всегда одинаковы. Ферменты здесь играют видную роль, которая далеко еще не изучена.

#### V.

Методика эксплантаций т. о. вполне оправдала возложенные на нее надежды. Но это еще не дает нам права на основании описанных данных перенести наши выводы с животного на человека. Притом, как я уже указал, условия жизни тканей в эксплантате во многом отличаются от таковых в организме. Далее, мы еще очень далеки от полных представлений об изменениях во всех *нормальных* тканях под влиянием лучей, чтобы понять действие их при лечебных освещениях. Начатые мною исследования над нормальными здоровыми органами лягушки представляют лишь первые шаги в этом направлении (Schubert). Методика эксплантаций еще слишком юна (20 лет); радиобиологи лишь только начинают с нею знакомиться. Проблемы радиобиологии еще ждут своего разрешения при самом активном участии нашей методики, которая поможет нам разобраться в явлениях, лежащих и вне пределов, достижимых оптикой микроскопа. *Qui vivra verra.*

#### ЛИТЕРАТУРА.

- 1) Prime Fr. and Wood F. C. Strahlentherapie, Bd. XII, 1921, S. 1071.—2) Prime. Journ. of cancer research, vol. V, 1920, p. 120.—3) Strangeways T. S. P. and Hoopwood. Proc. of the Royal Soc, ser. B., v. 100, p. 283.—4) Roffo. Strahlentherapie, Bd. 19, H. 4, 1925, S. 745.—5) Гасуль Р. Труды I Всесоюз. Съезда Патологов, 1923, стр. 469.—6) Он же. Отчет о II Всесоюз. Съезде Рентгенол., май, 1924, стр. 66, в Вестнике Рентг. и Радиол.—7) Он же. Fortschritte a. d. Geb. d. Röntgenotr., 1925, Bd. 33, S. 801.—8) Он же. Archiv. f. experim. Zellforschung, Bd. 1, H. 2.—9) Он же. Klinische Woch., 1926.—10) Он же. Ibidem, Bd. III, H. 1, S. 91—100.—11) Он же. Вестник Рентгенологии и Рад., т. IV,

- вып. 3, стр. 83—94.—12) Он же. *Ibid.*, т. V, вып. 1, стр. 11—22.—  
13) Он же. *Strahlentherapie*, 1927, Bd. 27, H. 3.—14) Кронтовский  
А. А. *Klin. Woch.*, 1925, № 41.—15) Он же. *Strahlentherapie*, Bb. 21,  
1926, S. 12—22.—16) Он же. *Экспер. и Клинич. Рентгенол.*, 1926, прил.  
к „*Врачеб. Делу*“, стр. 9—17.—17) Sittenfield M. *Americ. Journ. of*  
*roentgenology a. rad.*, 1926, v. 15, p. 155.—18) Надсон Г. А. *Вестник*  
*Рентгенол.*, 1924.—19) Он же. *Biochem. Zeitschr.*, 1925.—20) Рохлина-  
Глейхевихт. *Compt. rend. d. Soc. d. biol.*, 1926, t. 94, № 4.—  
21) Неменов М. *Вестник Рентгенологии*, т. III, вып. 5.—22) Он же.  
*Strahlentherapie*, Bd. 20, 1925, S. 299—304.—23) Caspari. *Strahlen-*  
*therapie*, 1924, Bd. 18.—24) Schubert M. *Strahlentherapie*, 1927,  
Bd. 26.
-