

ЭМБРИОЛОГИЯ

Б. П. ТОКИН и А. Г. ФИЛАТОВА

**О ЖИДКОСТИ ПОЛОСТИ БЛАСТОЦИСТА**

(Представлено академиком К. М. Быковым 15 IV 1953)

Научное наследие И. Мечникова и А. Ковалевского обязывает изучать возникновение и смену в ходе развития организма тех или иных иммунологических свойств клеточных и неклеточных образований не как какие-то совершенно обособленные процессы, а как явления, неразрывно связанные с теми или иными формообразовательными процессами. Особенно многое предстоит сделать эмбриологам в этом направлении при изучении ранних стадий развития животных. Встает много вопросов: когда возникают фагоцитарные реакции в ходе развития тех или иных животных, имеют ли они иммунологическое значение на данной стадии развития, каково их формообразовательное значение, и многие другие вопросы. Важно выяснить, какое формообразовательное и иммунологическое значение имеют различные возникающие и меняющиеся в ходе эмбрионального развития жидкости «внутри» эмбрионов и во внезародышевых образованиях (например, жидкость полости бластулы амфибий, амниотическая и аллантаисная жидкости разных животных и т. д.).

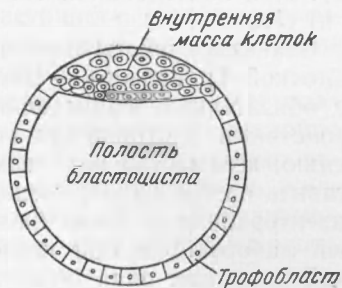


Рис. 1

В этой статье мы сообщаем результаты наших экспериментов с жидкостью полости бластоциста у кроликов. Напомним, что у млекопитающих дробление оплодотворенного яйца начинается в начале яйцевода и продолжается во время передвижения по нему. Дробление приводит к образованию плотного клеточного шара. Не все клетки этого шара идут на образование собственно зародыша. Яйцо на этой стадии достигает матки, начинается очень своеобразный и далеко еще не изученный процесс имплантации яйца в стенку матки. На одной стороне плотного шара образуется полость, наполняющаяся жидкостью: яйцо и полость в нем довольно быстро увеличиваются. Образуется полный шар, к одной из стенок которого прилегает изнутри скопление клеток, так называемый зародышевый узелок, который и дает материал для самого зародыша, а остальные клетки (наружного слоя), составляющие трофобласт, играют роль в процессе питания зародыша и, может быть, имеют еще какое-либо значение. Эта стадия развития носит название бластодермического пузырька или бластоциста (см. рис. 1). Нас заинтересовал неизученный в эмбриологии вопрос о формообразовательном и иммунологическом значении жидкости полости бластоциста. Ниже мы приводим материалы о бактерицидных свойствах этой жидкости\*.

\* В нашей работе большое участие принимала микробиолог Е. М. Данини. Пользуемся случаем принести ей искреннюю благодарность.

Техника операций и микробиологические методики исследований. Мы изучали эмбрион кролика (порода шиншилла). У кроликов имплантация зародышей в стенку матки происходит на 7 день после оплодотворения. Мы изучали жидкость бластодермического пузырька на 7—8 дни после покрытия самки. Операция производится под общим наркозом (эфирный или внутривенный — 2% раствор хлоралгидрата в количестве 10—15 см<sup>3</sup>). Операционное поле закрывается стерильными салфетками. Послойно по средней линии вскрывается на протяжении 6—8 см брюшная полость. Края раны захватываются зажимами Холстэда, рана расширяется. Извлекаются оба рога матки, причем нередко выпадают и кишечные петли. Время от времени извлеченные органы смачиваются подогретым стерильным физиологическим раствором. Диаметр зародыша на 7—8 день после покрытия самки приблизительно равен 3—4 см. Туберкулиновым шприцем (градуированным на сотые доли кубического сантиметра) отсасывается жидкость полости бластоциста. Она прозрачна, несколько вязкой консистенции. От каждого зародыша удается взять приблизительно 0,03—0,05 см<sup>3</sup> жидкости. При взятии указанного количества жидкости видимого спада, сморщивания или уменьшения объема бластоциста не наблюдается. После изъятия иглы из полости бластоциста жидкость не изливается (энергичное замыкание отверстия вследствие эластичности трофобласта?). После этого брюшная полость послойно зашивается узловатыми швами. Можно использовать обычные швейные нитки (катушки №№ 40—50). При исследовании бактерицидных свойств проведены опыты *in vitro* и *in vivo*.

Ставились опыты только с одним штаммом бактерий — дизентерийной палочкой Григорьева — Шига. Конечно, был большой риск: совершенно не обязательно, чтобы испытуемая жидкость обладала бактерицидными свойствами в отношении любой эмпирически взятой бактерии. К сожалению, количество получаемой жидкости столь невелико, что не удается ставить опыты одновременно со многими бактериями. С другой стороны, дизентерийная палочка была избрана не совершенно произвольно. В нашей лаборатории при исследовании бактерицидных свойств амниотической жидкости ряда животных обнаружен бактерицидный эффект именно в отношении этого штамма бактерий. В отдельных случаях удалось поставить опыты и с другими бактериями, о чем специально в каждом случае будет оговорено.

Опыты *in vitro*. Жидкость полости бластоциста незамедлительно помещается в стерильную пробирку. При испытании жидкости на ее бактерицидные свойства использовался так называемый «контактный способ»: к ней прибавлялась эмульсия бактерий в физиологическом растворе, приготовленная по стандарту (в 1 см<sup>3</sup> содержится 100 млн. микробных тел). Объемное отношение испытуемой жидкости и эмульсии бактерий 3 : 1.

Высевы (из пробирок, находившихся в термостате при 37°) на плотную питательную среду производились: тотчас, через 30 мин., через 1, 2, 3, 4 часа и, если это требовалось через 18 час. Контролем служили высевы из «смеси» физиологического раствора и эмульсии бактерий (объемные отношения 3 : 1). Результаты регистрировались через 18 час. термостатного содержания. В случае отсутствия роста определялась стерильность посева путем посева на плотную же питательную среду. Удалось поставить опыты с бластодермической жидкостью, полученной от эмбрионов у 8 кроликов. Все они дали положительный результат. Данные всех опытов сведены в табл. 1.

Опыты *in vivo*. Так же как и в опытах *in vitro*, операция проводилась на 7—8 дни после покрытия. Выращенная на косом агаре культура бактерий непосредственно перед операцией смывалась физиологическим раствором и затем доводилась по стандарту до миллиарда в

Результаты опытов по изучению бактерицидных свойств бластодермической жидкости и крольчих в отношении дизентерийной палочки Григорьева—Шига (рост колоний через различные промежутки времени)

№ кроликов	Срок беременности в днях	Тотчас	30 м.	1 ч.	2 ч.	3 ч.	4 ч.	5 ч.	Примечание
1	7	++++	++++	+++	+	0	0	0	В контрольных посевах при всех указанных экспозициях сливной рост дизентерийной палочки Григорьева—Шига
2	8	++++	++	+	+	0	0	0	
3	8	++++	+	0	0	0	0	0	
4	8	++++	++	++	+	+	0	0	
5	8	++++	++++	++++	+	0	0	0	
6	8	++++	++++	++	0	0	0	0	
7	8	++++	++++	+	+	+	+	0	
8	8	++++	+	0	0	0	0	0	

Условные обозначения количества колоний: ++++ — сливной рост, +++ — больше 100 колоний, ++ — больше 50 колоний, + — не больше 10 колоний, 0 — отсутствие роста.

1 см<sup>3</sup>. Затем путем разведения достигали того, что в 0,1 см<sup>3</sup> было 100—200 микробных тел, и нередко количество их доходило до 1000. Последнее разведение делали в бульоне. Туберкулиновым шприцем вводилось 0,05 см<sup>3</sup> бактериальной эмульсии в полость бластоциста. Непосредственно перед этим производился контрольный высев с целью проверки «концентрации бактерий» в бактериальной эмульсии.

Прокол иглой трофобласта и введение бактерий в полость бластоциста удаются достаточно легко. После этого брюшная полость послойно закрывалась наглухо. На следующий день животные снова оперировались. Из каждого бластодермического пузырька шприцем бралась жидкость в количестве 0,05 см<sup>3</sup> для высева на плотную среду. В большинстве случаев эта жидкость казалась обычной, прозрачной, но были случаи, когда жидкость была мутная. Нам удалось поставить опыты с 77 зародышами. Положительный результат, т. е. совершенно очевидный бактерицидный эффект был получен в 51 случаях, из них 46 случаев в отношении дизентерийной палочки Шига, а 5 — палочки Флекснера. Из 26 опытов с отрицательными результатами 22 были поставлены с дизентерийной палочкой Шига и 4 — с дизентерийной палочкой Флекснера. Такой огромный процент очевидных положительных случаев кажется тем более удивительным, что, конечно, мало вероятно предполагать, чтобы при самых неблагоприятных условиях развития у эмбриона была возможность «встречи» зародыша одновременно с сотнями и тысячами бактерий. Впрочем, из факта большой бактерицидной активности тех или иных клеточных и неклеточных образований еще нельзя, конечно, сделать заключение об их иммунологическом значении. Об этом мы будем иметь возможность говорить в других работах. 26 опытов с отрицательными результатами свидетельствуют о том, что для использованных в опытах бактерий имеется возможность размножения в полости бластоциста в случае, если по каким-либо причинам бластодермическая жидкость теряет присущие ей бактерицидные свойства. Мы не имеем возможности сообщать здесь многочисленные интересные детали, обнаруженные в опытах с положительными и отрицательными результатами. На некоторых вопросах, однако, необходимо остановиться.

1. Во всех 51 положительных случаях опытов жидкость полости бластоциста, взятая на следующий день после инъекции бактерий, была прозрачной. Если же жидкость оказывалась мутной, то при высевах, как правило, наблюдался рост бактерий. В этих случаях выделенная чистая

культура изучалась на агглютинирующие и биохимические свойства. Мы убедились при этом, что выделенная культура бактерий была именно той, которую мы использовали при инъекции в полость бластоциста.

2. Бластодермическая жидкость разных зародышей одной и той же самки может существенно отличаться. Приведем примеры. Самка оперирована на 8-й день покрытия. В полости 7 бластоцистов введено совершенно одинаковое количество бактериальной эмульсии (дизентерийная палочка Григорьева — Шига). На следующий день сделаны высевы. В четырех случаях посевы оказались стерильными, а в трех — обильный специфический рост. Другой пример. Самка на 8-й день покрытия. Введена культура палочки Шига в полости 8 бластоцистов. При одновременном введении культуры в полость бластоцистов производился контрольный посев эмульсии в объеме 0,05 см<sup>3</sup> на плотную среду, выросло 754 колонии. Таким образом, в полость каждого из 8 бластодермических пузырьков (с соблюдением одних и тех же технических приемов и условий) вводилось около 700 бактерий. Результаты опытов (высев из каждого бластоциста через сутки): в двух случаях — стерильная картина; в двух случаях зарегистрирован сплошной, сливной рост; в одном случае выросло всего две колонии; в остальных случаях при высевах оказалось 18, 7 и 65 колоний.

3. В некоторых случаях с отрицательными результатами (т. е. когда высев через сутки после пребывания бактерий в полости бластоциста давал картину, сходную с контролем) далеко не всегда можно было утверждать, что бластодермическая жидкость не оказывает никакого действия на бактерии, так как при специфическом обильном росте мы наблюдали, однако, сильно измененные морфологически колонии дизентерийной палочки Шига: они были мелкими, прозрачными.

Таким образом, из всех опытов *in vitro* и *in vivo* можно сделать совершенно определенный вывод: жидкость полости бластодермического пузырька зародышей кролика обладает бактерицидными свойствами. Необходимо дальнейшие исследования с другими микроорганизмами, особенно с теми, которые могут оказаться патогенными для материнского организма или зародыша.

Подобные исследования могут дать ценный материал для разработки вопросов иммунитета зародышей. Одновременно необходимо выяснение формообразовательного значения достаточно загадочной еще для эмбриологии бластодермической жидкости — этой, так сказать, «внутренней среды» развивающегося эмбриона.

Ленинградский государственный университет  
им. А. А. Жданова  
Институт экспериментальной медицины  
Академии медицинских наук СССР

Поступило  
10 IV 1953

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> Х. Н. Гирфанова, ДАН, 68, №№ 5 и 6 (1949). <sup>2</sup> Г. Н. Короткова, Л. С. Приезжаева, Вестн. ЛГУ, № 7 (1952). <sup>3</sup> Б. П. Токин, Усп. совр. биол., № 4 (1952). <sup>4</sup> Б. П. Токин, Вопросы иммунитета эмбрионов. Тезисы докладов на конференции ЛГУ, 1950.