УДК 612.017.1:616.36—002

І. М. Алексеева

ВМІСТ РОЗЕТКОУТВОРЮВАЛЬНИХ КЛІТИН В ЛІМФОЇДНИХ ОРГАНАХ ЩУРІВ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО УРАЖЕННЯ ПЕЧІНКИ

Роль печінки в розвитку імунологічних реакцій організму на негепатогенні антигени мало вивчена. В дорослому організмі за нормальних умов печінка не вважається імунокомпетентним органом. Однак вона має безпосереднє відношення до утворення таких факторів, як комплемент і пропердин [5], до переробки антигенного матеріалу — першого етапу в імунній відповіді [35], до обміну речовин, який забезпечує енергетичні та пластичні потреби імунної відповіді. Є думка про те, що здорова печінка виділяє фактор, який впливає на клітинні імунні реакції, зокрема на міграцію лейкоцитів [12].

При ураженні печінки в ній збільшується кількість плазматичних клітин [14], починають проліферувати купферовські клітини, в синусоїди та портальний тракт залучаються лімфоцити [22], що свідчить про можливість безпосередньої участі печінки в імуногенезі.

На підставі всього сказаного можна чекати зміни імунологічних реакцій в організмі при ураженні печінки. Дані літератури про характер цих змін суперечливі. З одного боку, показано, що при прогресуючій формі хронічного гепатиту спостерігається дискооперація імунокомпетентних клітин [6], при цирозах печінки — зниження лізоциму та комплементу [5, 7], при ураженні печінки чотирихлористим вуглецем — зниження резистентності морських свинок до дизентерійної інфекції [4]. З іншого боку, одержано дані про те, що токсичне ураження печінки у кроликів чотирихлористим вуглецем приводить до посилення антитілогенезу на еритроцити барана та білки сироватки крові людини [13]. Автори цих останніх досліджень роблять висновок, що при патології печінки підвищується імунологічна реактивність організму, на фоні чого легко виникають аутоімунні ускладнення.

Сучасні уявлення про антитілогенез на більшість антигенів грунтуються на участі кількох видів клітин у цій реакції, головними з яких є В-лімфоцити (клітини кістковомозкового походження — попередники антитілоутворювальних плазматичних клітин), Т-лімфоцити (тимусзалежні клітини) і макрофаги [19, 27]. Показано, що Т-клітини є регуляторами імунної відповіді [31, 33, 36]. Вони виступають у ролі допоміжних клітин при диференціації В-клітин в антитілоутворювальні [25, 26], але можуть бути (можливо, їх субпопуляції) і супресорами імунної відповіді [32, 34]. Однією з функцій Т-лімфоцитів є також розпізнавання чужорідної антигенної інформації, завдяки присутності на їх поверхні антигенрозпізнавальних рецепторів [11, 28].

В останні роки для визначення Т- і В-лімфоцитів у крові людини широко застосовується метод розеткоутворення [23, 24, 17]. Вважають, що лімфоцити, які утворюють спонтанні розетки з інтактними еритроцитами барана, можна вважати Т-лімфоцитами, а лімфоцити, що утворю-

ють розетки з еритроцитами, навантаженими гемолізином і комплементом (імунні розетки), відносять до В-лімфоцитів, які містять на своїй поверхні три види рецепторів: імуноглобулін, Fc-рецептор, комплемент-рецептор (С'3-рецептор).

У тварин спонтанні розетки, утворені лімфоцитами та інтактними гетерогенними еритроцитами, більше називають Е-розетками, а розетки, утворені лімфоцитами і гетерогенними еритроцитами, навантаженими гемолізином та комплементом,— ЕАС-розетками. Деякі автори вважають, що клітини, які утворюють ці розетки, можна віднести до Т- і В-лімфоцитів відповідно [18, 20, 21].

Метою даної роботи було вивчити зміни вмісту розеток обох видів — спонтанних та імунних у селезінці, мезентеріальних лімфовузлах і тимусі щурів при ураженні печінки чотирихлористим вуглецем або антигепатоцитотоксичною сироваткою (АГЦС). Наші раніше проведені дослідження [1, 2, 3] показали, що великі дози АГЦС викликають порушення функцій печінки, обмінних процесів у ній, та ураження її структури. Нормальна кроляча сироватка в таких же дозах викликає значно менш виражені зміни в печінці.

Методика досліджень

Розеткоутворювальні клітини в суспензії лімфоїдних органів неімунізованих щурів визначали з допомогою методів [16, 29]. Визначали два види розеткоутворювальних клітин: I — клітини, які утворювали розетки з 0,5% інтактними еритроцитами — спонтанні розетки; II — клітини, які утворювали розетки з 0,5% еритроцитами барана, навантаженими гемолізином і мишиним комплементом — імунні розетки. До 0,1 *мл* суспензії клітин селезінки, мезентеріальних лімфовузлів або тимуса, яка містила $2 \cdot 10^{-5}$ клітин, додавали 0,1 *мл* еритроцитів барана. Суміш витримували 5 *хв* при кімнатній температурі, потім центрифугували 5 *хв* при 200 *g*. При визначенні В-розеток суміш відразу ресуспендували і підраховували кількість розеток у камері Горяєва. При визначенні Т-розеток суміш після центрифугування витримували 1 *год* при 4° С, потім ресуспендували і підраховували кількість розеток. Розеткою вважали клітину, яка приєднала 4 і більше еритроцитів. Підраховували кількість розеток на 1000 клітин, що містять ядро. Розеткоутворювальна клітина селезінки наведена на рис. 1. Розраховували також загальну кількість клітин на селезінку і тимус.

При ураженні печінки чотирихлористим вуглецем його вводили щурам під шкіру триразово через два дні на третій в кількості 0,5 *мл*/100 *г* ваги тіла при розведенні соняшниковою олією 1 : 1.

При ураженні печінки антигепатоцитотоксичною сироваткою її вводили щурам внутрівенно 5 днів підряд в дозі 0,2—0,3 *мл*/100 *г* ваги тіла. Титр сироватки в РЗК з гомогенатом печінки становив 1 : 320—1 : 400, з гомогенатом суміші тимуса, селезінки, лімфовузлів — 1 : 20—1 : 50. Нормальну кролячу сироватку (НКС) вводили за схемою і в дозах, аналогічних введенню АГЦС. Визначення розеткоутворювальних клітин проведено на 3—5—25 добу після останнього введення CCl_4, АГЦС, НКС.

Досліди проведені на 109 щурах неінбредної лінії Вістар. Дані оброблені статистично із застосуванням критерію Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення

У інтактних тварин клітини, що утворюють спонтанні та імунні розетки, в досліджених лімфоїдних органах розподілялися так: у селезінці на 1000 клітин, що містять ядро, спонтанних розеток 21±5, імунних розеток 96±25; в мезентеріальних лімфовузлах спонтанних розеток 6±±2, імунних розеток 31±5; в тимусі спонтанних розеток 4±2, імунних розеток 5±1. Отже, найбільша кількість розеткоутворювальних клітин визначалась у селезінці, найменша — в тимусі. В усіх досліджених органах клітин, що утворюють імунні розетки, було більше, ніж клітин, що утворюють спонтанні розетки.

Незначний вміст розеткоутворювальних клітин у тимусі відзначається й іншими авторами [21]. Також описано, що тимус, який формує

тимусзалежні зони периферичних лімфоїдних органів, сам містить імунологічно незрілі клітини [8].

Застосування чотирихлористого вуглецю привело до різкого зменшення кількості спонтанних розеток у лімфоїдних органах (рис. 2, *I*). В селезінці на третю добу після останнього введення CCl_4 кількість спонтанних розеток зменшилась понад п'ять разів ($p<0,01$), потім почалося їх відновлення і на 25 добу кількість спонтанних розеток не від-

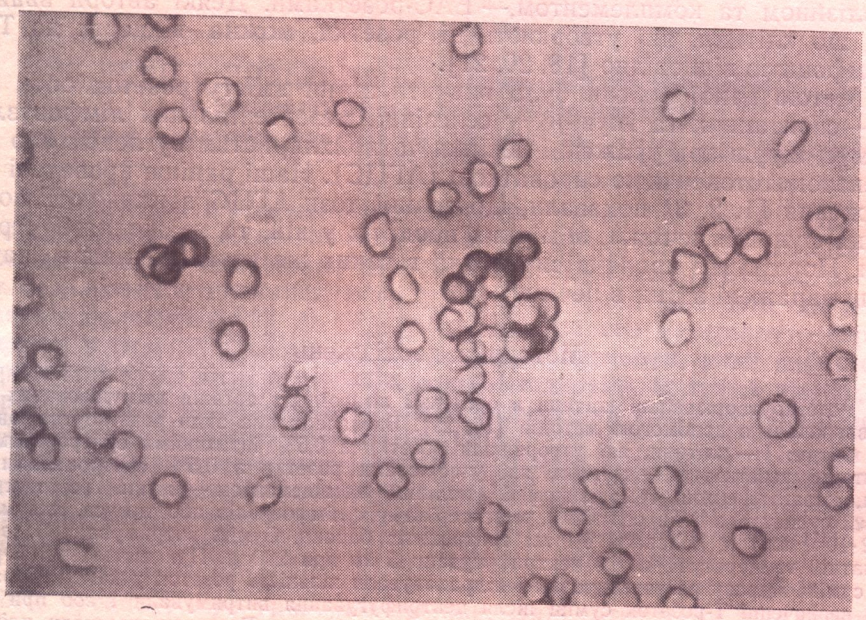

Рис. 1. Розеткоутворювальна клітина в селезінці.
Мікрофото із застосуванням фазового контрасту. Ув. ×320.

різнялася від рівня в контролі. В мезентеріальних лімфовузлах на третю добу також відзначалось зменшення кількості спонтанних розеток майже в три рази з наступним відновленням до вихідного рівня. В тимусі на третю добу спонтанних розеток зовсім не визначалось, їх кількість залишалася зниженою до 25 доби.

Вміст імунних розеток в усіх лімфоїдних органах істотно не змінювався під впливом CCl_4 (рис. 2, *II*). Виявлено лише тенденцію до збільшення їх кількості на п'яту добу, однак це збільшення було статистично недостовірним.

Застосування CCl_4 супроводжувалось також зменшенням загальної кількості клітин у селезінці і тимусі (рис. 3). В селезінці це зменшення було виражене на 25 добу: контроль — $(384\pm31)\cdot10^6$, 25 доба після CCl_4 — $(286\pm38)\cdot10^6$, $p<0,05$. В тимусі максимум зменшення доводився на п'яту добу: контроль — $(403\pm71)\cdot10^6$, п'ята доба після введення CCl_4 — $(101\pm14)\cdot10^6$, $p<0,001$.

Після введення АГЦС також спостерігається зменшення вмісту спонтанних розеток у селезінці (рис. 2, *I*), найбільш виражене на третю добу після останнього введення сироватки (контроль 21 ± 5, третя доба після АГЦС — 8 ± 2, $p<0,05$). В мезентеріальних лімфовузлах і тимусі статистично достовірних змін вмісту спонтанних розеток не виявлено.

Вміст імунних розеток в лімфоїдних органах щурів під впливом

АГЦС істотно не змінювався (рис. 2, *II*), можна лише говорити про незначну тенденцію до їх збільшення.

Загальна кількість клітин у тимусі проявляє тенденцію до зменшення на третю — п'яту добу (рис. 3). В селезінці ж відбувається різке, в усі строки статистично достовірне збільшення кількості клітин, що міс-

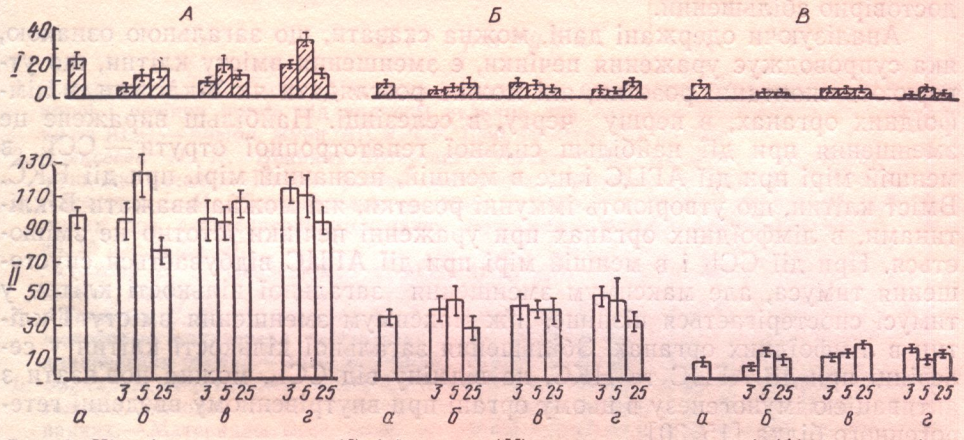

Рис. 2. Кількість спонтанних (*I*) і імунних (*II*) розеток у селезинці (А), мезентеріальних лімфовузлах (*Б*) і тимусі (*В*) після введення CCl_4, АГЦС та НКС.

а — норма, *б* — CCl_4, *в* — АГЦС, *г* — НКС. По вертикалі — кількість розеткоутворювальних клітин на 1000 лімфоїдних клітин, по горизонталі — доби після введення речовин.

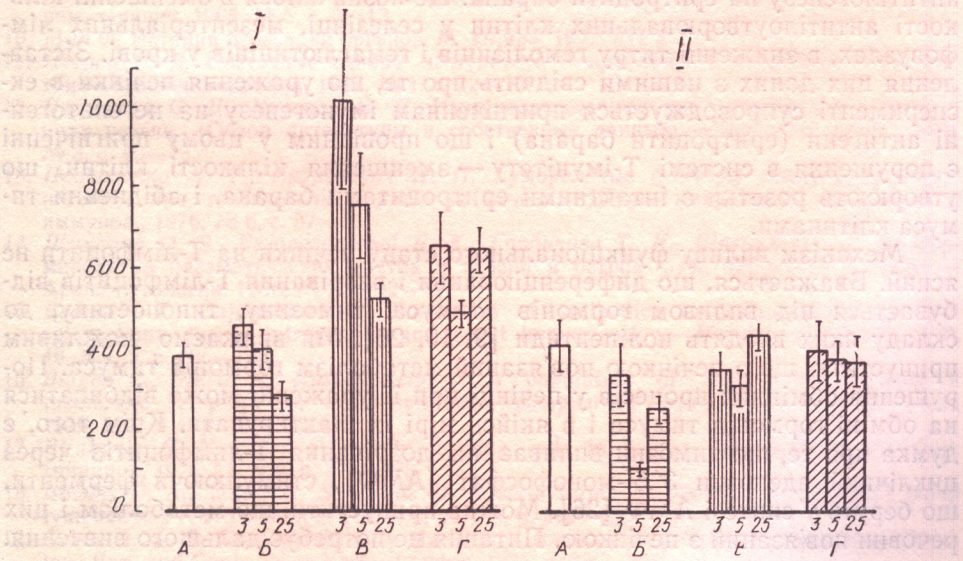

Рис. 3. Загальна кількість клітин у селезінці (I) і тимусі (II) після введення CCl_4, АГЦС, НКС.

А — норма, *Б* — CCl_4, *В* — АГЦС, *Г* — НКС. По вертикалі — кількість клітин ($\times 10^6$) в органі, по горизонталі — доби після введення.

тять ядро: контроль — $(384 \pm 31) \cdot 10^6$, третя доба після АГЦС — $(1010 \pm 220) \cdot 10^6$, $p < 0{,}05$, п'ята доба — $(753 \pm 130) \cdot 10^6$, $p < 0{,}02$, 25 доба — $(526 \pm 42) \cdot 10^6$, $p < 0{,}02$.

При введенні нормальної кролячої сироватки, на відміну від CCl_4 та АГЦС, в ранні строки не відбувається зменшення вмісту спонтанних розеток у селезінці, лише на 25 добу можна говорити про тенденцію до

їх зменшення (контроль — 21±5, 25 доба — 11±2, $p>0,05$). В лімфовузлах і тимусі відзначається тенденція до зменшення їх кількості. Кількість імунних розеток в усіх лімфоїдних органах під впливом НКС істотно не змінювалась. Загальний вміст клітин у тимусі під впливом НКС істотно не змінювався, а в селезінці в усі строки був статистично достовірно збільшений.

Аналізуючи одержані дані, можна сказати, що загальною ознакою, яка супроводжує ураження печінки, є зменшення вмісту клітин, що утворюють спонтанні розетки, які можна розглядати як Т-клітини, в лімфоїдних органах, в першу чергу, в селезінці. Найбільш виражене це зменшення при дії найбільш сильної гепатотропної отрути — CCl_4, в меншій мірі при дії АГЦС і ще в меншій, незначній мірі, при дії НКС. Вміст клітин, що утворюють іммунні розетки, які можна вважати В-клітинами, в лімфоїдних органах при ураженні печінки істотно не змінюється. При дії CCl_4 і в меншій мірі при дії АГЦС відбувається спустошення тимуса, але максимум зменшення загальної кількості клітин у тимусі спостерігається пізніше, ніж максимум зменшення вмісту Т-клітин в лімфоїдних органах. Збільшення загальної кількості клітин у селезінці при дії АГЦС та НКС, на відміну від CCl_4, можна пов'язати з активацією імуногенезу в цьому органі при внутрівенному введенні гетерогенного білка [15, 30].

В нашому відділі М. В. Ільчевичем та Л. І. Антоненко встановлено, що ураження печінки антигепатоцитотоксичною сироваткою, яку застосовували за такою ж, як і ми, схемою, приводить до пригнічення антитілогенезу на еритроцити барана. Це позначалося в зменшенні кількості антитілоутворювальних клітин у селезінці, мезентеріальних лімфовузлах, в зниженні титру гемолізинів і гемаглютинінів у крові. Зіставлення цих даних з нашими свідчить про те, що ураження печінки в експерименті супроводжується пригніченням імуногенезу на негепатогенні антигени (еритроцити барана) і що провідним у цьому пригніченні є порушення в системі Т-імунітету — зменшення кількості клітин, що утворюють розетки з інтактними еритроцитами барана, і збіднення тимуса клітинами.

Механізм впливу функціонального стану печінки на Т-лімфоцити не ясний. Вважається, що диференціювання і визрівання Т-лімфоцитів відбувається під впливом гормонів тимуса: тимозину, типопоетину, до складу яких входять поліпептиди [9, 10, 26]. Ми вважаємо можливим припустити, що з печінкою пов'язаний метаболізм гормонів тимуса. Порушення обмінних процесів у печінці при її ураженні може відбиватися на обміні гормонів тимуса і в якійсь мірі їх інактивувати. Крім того, є думка про те, що тимозин впливає на дозрівання Т-лимфоцитів через циклічний аденозин 3′,5′-монофосфат (АМФ), стимулюючи ферменти, що беруть у синтезі АМФ [26]. Можна припустити, що метаболізм і цих речовин пов'язаний з печінкою. Питання це потребує дальшого вивчення.

Висновки

1. У інтактних щурів у селезінці, мезентеріальних лімфовузлах і тимусі виявляються клітини, що утворюють розетки з інтактними еритроцитами барана — спонтанні розетки і клітини, що утворюють розетки з еритроцитами барана, навантаженими гемолізином і мишачим комплементом — імуннні розетки. За кількістю розеткоутворювальних клітин на першому місті стоїть селезінка, на останньому — тимус. Імунних розеток в усіх органах більше, ніж спонтанних.

2. Ураження печінки чотирихлористим вуглецем та антигепатоцито-

токсичною сироваткою супроводжується зменшенням вмісту клітин, що утворюють спонтанні розетки в усіх лімфоїдних органах, особливо в селезінці, без істотної зміни вмісту клітин, що утворюють іммунні розетки.

3. Ураження печінки CCl_4 і в меншій мірі великими дозами АГЦС супроводжується зменшенням загальної кількості клітин у тимусі.

Література

1. *Алексєєва І. М.* Зміни білкового складу та активності трансаміназ сироватки крові і печінки щурів під впливом великих доз антигепатоцитотоксичної сироватки та АЦС.— Фізіол. журн. АН УРСР, 1968, **14**, № 6, с. 774—781.
2. *Алексеева И. Н.* Влияние антигепатоцитотоксичной сыворотки на экскреторную функцию печени.— Патол. физиол. и эксперим. терапия, 1973, № 2, с. 72—74.
3. *Алексєєва І. М.* Жовчовидільна функція печінки в умовах застосування великих і малих доз антигепатоцитотоксичної сироватки.— Фізіол. журн. АН УРСР, 1974, **20**, № 5, с. 602—607.
4. *Астахова В. С.* Особенности течения дизентерии Зоне на фоне панкреатита и гепатита. Автореф. канд. дис., К., 1976. 23 с.
5. *Афанасьев С. С., Афанасьева К. А., Чирнин Ю. Д., Аблаева Т. Д., Подобезов Г. М.* Некоторые показатели неспецифического иммунитета при циррозе печени и их клиническая оценка.— Сов. медицина, 1975, № 5, с. 103—107.
6. *Блюгер А. Ф., Векслер Х. М.* Основные типы кооперации клеток антиген-чувствительной единицы (АЧЕ) при некоторых инфекционных и аутоиммунных заболеваниях.— Материалы Всес. конф. по общей и прикладной иммунол., ч. 1. М., 1974, с. 22—23.
7. *Бондарь З. А., Финогенова Л. Г., Золотницкая Р. П.* Некоторые иммунологические показатели у больных циррозом печени.— Сов. медицина, 1968, № 3, с. 15—20.
8. *Линг Н. Р.* Стимуляция лимфоцитов. М., «Медицина», 1971. 287 с.
9. *Миллер Д.* Роль вилочковой железы в иммуногенезе.— Патол. физиол. и эксперим. терапия, 1965, № 5, с. 3—13.
10. *Мур Ф.* История пересадки органов. М. «Мир», 1977. 311 с.
11. *Петров Р. В.* Клеточные основы иммунитета и проблемы клинической иммунологии.— Клинич. медицина, 1976, № 1, с. 12—18.
12. *Подымова С. Д., Насонов Е. Л.* Иммунодепрессанты при хронических заболеваниях печени. (Обзор литературы и собственные данные).— Терапевт. архив, **1976**, № 3, с. 40—48.
13. *Прокопенко Л. Г., Кедровская Н. Н.* Гуморальные факторы стимуляции иммуногенеза при токсическом поражении печени.— Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол., 1976, № 6, с. 57—62.
14. *Шумкина О. Б., Безпрозванный Б. К., Горбунова Т. И., Шахгильзян И. В.* Формирование плазматических клеток в печени в острой фазе вирусного гепатита.— Архив патологии, 1968, № 7, с. 42—49.
15. *Bednařik T., Cajthamlova H.* Formation of antibodies to immunoglobulins after splenectomy during intravenous and depot immunization.— Physiol. bohemosl., 1970. **19**, N 1, 2, p. 135—138.
16. *Bianco C., Patric R., Nussenzweig V.* A population of lymphocytes, bearing a membrane receptors for antigenantibody—complement complexes.— J. Exp. Med., 1970, **132**, N 4, p. 702—720.
17. *Birnbaum G.* Numbers of rosette forming cells in human peripheral blood.— Cell. Immunol., 1976, **21**, N 2, p. 371—378.
18. *Bowles C. A., White G. S., Lucas D.* Rosette formation by canine peripheral blood lymphocytes.— J. Immunol., 114. N 1, part. 2, p. 399—402.
19. *Davis A. J. S.* Co—operation is the thing. Immune Reactivity Lymphocytes. Develep., Exp. and Contr., New York—London, 1976, p. 331—333.
20. *Escajadillo C., Binns R. M.* Rosette formation with sheep erythrocytes — a possible T-cell marker in the pig.— Int. Arch. Allerg. and Appl. Immunol., 1975, **48**, p. 261—275.
21. *Franceschi C., Perocco P., Paolucci P., Prodi G.* Selective effect on T and B cell subpopulations in Rat Lymphoid Organs after Urethan Treatment.— Int. Arch. Allerg. and Appl. Immunol., 1976, **50**, p. 513—524.
22. *Garvey J. S.* Are cells in liver tissue relevant to immunology? — Immunochemistry, 1975, **12**, p. 637—640.
23. *Holland P. D. J., Browne O., Jhornes R. D.* The enhancing influence of proteolysis on E Rosette Forming Lymphocytes (T-cells) in vivo and in vitro.— Brit. J. Cancer., 1975, **31**, p. 164—169.
24. *Jonsson M. D.* Technical Aspects of the Rosette Technique for Detecting Human Circulating B- and T-Lymphocytes.— Scand. J. Haematol., 1974, **13**, p. 361—369.

25. *Kappler J. W., Hunter P. C., Jacobs D., Lord E.* Functional heterogeneity among the T-derived lymphocytes of the mouse.— J. Immunol., 1974, **113**, N 1, p. 27—38.
26. *Marx J. L.* Thymic hormones: Inducers of T cell maturation.— Science, 1975, **187**, N 4182, p. 1183—1185.
27. *Miller J. F., Mitchell G. E.* Cell to cell interaction in the immune response. I Hemolysin—forming cells in neonatally thymectomyzed mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes.— J. Exp. Med., 1968. **128**, p. 801—820.
28. *Möller G.* (Цит. по Ю. А. Уманскому «Иммунологическая реактивность при раке». К., «Здоров'я», 1974. 238 с.
29. *Robinson J. A., Letratanakul G. A.* Detection and Quantitation of T- and B-lymphocytes.— J. Immunol. Methods, 1975, 8, 1/2, p. 53—60.
30. *Rodak L. A* histoautoradiographic study of the localization of antigen and specific antibodies in the rabbit spleen. I. Comparison of the Primary and Secondary Immune Response.— Z. Immun.— Forsch., 1976, **151**, p. 46—60.
31. *Sheares G. M., Weinstein G., Melmon K. L.* Enchancement of immune response potential of mouse lymphoid cells fractionated over insolubilized conjugated histamine columns.— J. Immunol., 1974, **113**, N 2, p. 597—607.
32. *Tada T., Takemori T.* Selective role of thymus-derived lymphocytes in the antibody response. I. Differential suppressive effect of carrier primed T cells on haptenspecific IgM and IgG antibody responses.— J. Exp. Med., 1974, **140**, N 1, p. 239—252.
33. *Tamura S. J., Egashira Y.* Cellular and humoral immune responses in mice. III. Acceleration of delayed hypersensitivity responses by presensitization with suboptimal dose of antigen.— Immunology, 1976, **30**, p. 705—713.
34. *Taniguchi M., Tada J., Takuhisa J.* Properties of the antigen-specific suppressive T-cell factor in the regulation of antibody response of the mouse III. Dual gene control of the T--cell mediated suppression of the antibody Response.— J. Exp. Med., 1976, **144**, p. 20—31.
35. *Triger D. R.* The liver as an immunological organ.— Gastroenterology, 1976, **71**, N 1, p. 162—164.
36. *Warren R. W., Murphy S., Davie J. M.* Role of T-lymphocytes in the humoral immune response. II. T-cell-mediated regulation of antibody avidity.— J. Immunol., 1976, **116**, N 5, p. 1385—1390.

Відділ імунології і цитотоксичних сироваток Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця АН УРСР, Київ

Надійшла до редакції 22.IV 1977 р.

I. N. Alekseyeva

CONTENT OF ROSETTE-FORMING CELLS IN THE RAT LYMPHOID ORGANS UNDER CONDITIONS OF THE LIVER EXPERIMENTAL LESION

Summary

It is shown that in the spleen, mesenteric lyphonodes and thymus of the Wistar noninbred strain rats there are cells forming spontaneous and immune rosettes with the rat erythrocytes. As to the number of rosette-forming cells the spleen takes the first place and thymus the last one. In all organs there are more immune rosette, than spontaneous ones. The liver lesion with carbon tetrachloride or antihepatocytotoxic serum (AHCS) is accompanied by a decrease in the number of cells forming spontaneous rosette in all the lymphoid organs, particularly in the spleen, without essential changes in the content of the cells forming immune rosette. The liver lesion with CCl_4 is accompanied by a decrease in the number of cells in the thymus, in case of AHCS lesion this decrease is not so pronounced.

Department of Immunology and Cytotoxic Sera,
the A. A. Bogomolets Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR