

УДК 612.017.1:616.36—002

Н. В. Ильчевич, Ю. Г. Тимошенко

## СОДЕРЖАНИЕ РОК В ЛИМФОИДНОЙ ФРАКЦИИ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ АГЦС

До настоящего времени нет единого мнения относительно иммунологических потенций печени. В связи с этим несомненный интерес представляет исследование конкретных условий включения этого органа в иммуногенез, а также возможностей стимулирования ее иммунокомпетентных способностей.

Согласно данным литературы, при некоторых видах патологии в антителогенезе участвуют не только селезенка и лимфоузлы, но и печень [6, 7, 9, 10]. Известно, что при различных патологических процессах увеличивается количество плазматических клеток. Установлено также активное участие лимфоцитов в патологическом процессе, выражающееся в выходе лимфоцитов из сосудистого русла, внедрении их в печеночные клетки и активном разрушении гепатоцитов. Наиболее существенной частью популяции фиксированных макрофагов с функциональной точки зрения являются купферовские клетки. В настоящее время каких-либо убедительных данных о лимфоцитарной трансформации купферовских клеток нет, хотя описаны обширные трансформационные возможности их [5]. Поскольку известно, что розеткообразующими являются клетки, ответственные за иммунологические реакции, то, пользуясь методом розеткообразования, можно определить иммунокомпетентную функцию лимфоидной ткани печени.

Установлено, что большие дозы АГЦС вызывают повреждение печени и нарушение в ней обменных процессов [1, 2, 3]. Нарушение функции печени приводит к сдвигу иммунного статуса в организме, что проявляется в уменьшении антителообразующих клеток в селезенке, мезентериальных узлах, в снижении титров гемолизина и геагглютининов в крови [8]. Ведущим в этом угнетении являются нарушения в системе Т-иммунитета — уменьшение количества клеток, образующих розетки с интактными эритроцитами барана, и обеднение тимуса клетками [4].

Мы изучали содержание спонтанных и иммунных розеткообразующих клеток, которые можно отнести к Т- и В-клеткам, соответственно, в лимфоидных элементах печени у интактных крыс, а также у крыс в условиях применения АГЦС.

### Методика исследований

В настоящее время наиболее распространенные методы выделения лимфоидных клеток из печени, основанные на использовании фермента проназы [15, 16]. Однако, для выделения лимфоидных клеток мы пользовались ферментом трипсином. Печень тщательно перфузировали физиологическим раствором в течение 5 мин при температуре 20° С, измельчали ножницами в чашке Петри, погружали в 0,0001% раствор трипсина на 20 мин. После фильтрации и центрифугирования (500 g — 10 мин) клетки ресуспендировали в 199 среде, отмывали и центрифугировали дважды при 160 оборотах в течение 15 мин. После последнего отмывания клетки вновь суспендировали в 10 мл

трипсина, разведенного в 199 среде, и инкубировали в термостате в течение 30 мин при 37° С. Затем их выделяли из раствора трипсина центрифугированием при 500 g в течение 15 мин. Повторное центрифугирование производилось при 160 g в течение 30 мин. После последнего отмывания надосадочную жидкость сливали и клетки ресуспендировали в 199 среде до концентрации  $2 \cdot 10^6$ . Были сделаны мазки полученных лимфоидных элементов, которые окрашивали по Романовскому—Гимза. Полученные лимфоидные клетки использовали для постановки РОК у интактных крыс и после введения АГЦС.

Розеткообразующие клетки в суспензии лимфоидных фракций определяли с помощью [12, 17]. Выявляли клетки, которые образовывали розетки с 0,5% интактными эритроцитами — спонтанные розетки и клетки, которые образовывали розетки с 0,5% эритроцитами барана, нагруженными гемолизином и мышиним комплекментом — иммунные розетки. К 0,1 мл суспензии лимфоидных клеток прибавляли 0,1 мл эритроцитов барана с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 200 g, затем инкубировали в холодильнике 1 ч, ресуспендировали и подсчитывали количество Т-розонок в камере Горяева. При определении В-розонок смесь сразу ресуспендировали и подсчитывали количество розеток в камере Горяева.

При действии больших доз сыворотку вводили крысам внутривенно ежедневно в течение 5 дней в дозе 0,2—0,3 мл/100 г. Титр сыворотки в РСК с гомогенатом печени составил 1 : 320. Определение розеткообразующих клеток проводилось на 3, 10, 30 сут после последнего введения АГЦС. Опыты проведены на 46 крысах неинбредной линии Вистар. Данные обработаны статистически с применением критерия Стьюдента.

### Результаты исследований и их обсуждение

При изучении способности выявленных нами лимфоидных элементов печени образовывать розеткообразующие клетки с эритроцитами барана у интактных крыс было установлено, что количество розеткообразующих Т-лимфоцитов составило  $2,79 \pm 0,44$ , содержание В-розонок образующих лимфоцитов у интактных крыс —  $6,89 \pm 1,38$ .

Мы изучали содержание розеткообразующих Т- и В-клеток при пятикратном ежедневном введении больших доз антигепатоцитотоксической сыворотки.

Количество розеткообразующих Т- и В-лимфоцитов определяли на 3, 10 и 30 сут после последнего введения АГЦС.

Установлено, что количество розеткообразующих Т-лимфоцитов к третьим суткам после последнего введения АГЦС составило  $2,43 \pm 0,75$ , к десятым суткам их содержание было  $2,99 \pm 0,53$ , к тридцатым суткам наблюдалось статистически достоверное увеличение содержания Т-розонок образующих клеток ( $4,33 \pm 0,65$ ,  $p < 0,05$ ; см. таблицу).

При сравнении с содержанием Т-розонок образующих клеток в лимфоидной ткани печени у интактных крыс установлено, что после введения АГЦС содержание Т-розонок образующих клеток увеличивается достоверно только к 30 сут. Коэффициент корреляции значим и составляет при сравнении с 30 сут 0,242, в то время как с третьими сутками — 0,881, а сдесятыми — 0,910.

Нами установлено, что количество розеткообразующих В-лимфоцитов составило к третьим суткам  $11,7 \pm 0,31$ , к десятым суткам —  $10,2 \pm 1,63$ , 30 сут характеризовались уменьшением содержания В-розонок образующих клеток, и их количество составило  $8,69 \pm 1,17$  ( $p < 0,05$ ).

Сравнивая содержание В-розонок образующих клеток крыс, которым вводили АГЦС, и интактных крыс (без введения препарата), можно отметить увеличение В-розонок образующих клеток во все сроки исследования. Содержание В-розонок образующих лимфоцитов у интактных крыс составило  $6,89 \pm 1,38$ .

Коэффициенты корреляции в сравнении с 3, 10 и 30 сут составили соответственно 0,109; 0,981; 0,462 при  $p < 0,05$ .

В нашем отделе Н. В. Ильевичем и Л. И. Антоненко установлено, что поражение печени большими дозами АГЦС приводит к увеличению в печени антителообразующих клеток. Наши данные свидетельствуют

Содержание Т- и В-розеткообразующих клеток в лимфоидных фракциях печени  
у интактных крыс и после введения АГЦС

Интактные крысы		Сутки после введения АГЦС		
Т-кл	В-кл	3	10	30
4,9	14,1	Т-клетки		
6,0	2,0	1,3	2,4	2,0
7,0	26,0	0,9	5,0	2,4
2,0	3,0	7,1	7,2	2,5
2,0	6,2	0	2,3	3,6
4,6	11,0	2,5	2,1	9,4
2,0	16,0	0	2,0	3,7
0	3,0	0	1,7	4,8
6,0	4,0	5,9	2,2	4,8
2,0	4,0	3,4	1,7	6,0
2,0	6,0	$M \pm m$ 2,43 ± 0,75	2,99 ± 0,53	4,33 ± 0,65
1,0	6,0	$p < 0,05$	< 0,05	< 0,05
2,0	0	В-клетки		
2,0	3,0	14,4	12,1	7,1
1,6	2,0	7,3	11,0	4,1
2,1	7,8	6,9	8,0	8,0
1,0	6,0	9,0	10,5	1,8
4,0	8,0	10,7	7,1	7,1
1,0	3,0	13,9	6,8	6,8
$M \pm m$ 2,79 ± 0,44	6,89 ± 1,38	17,0	12,0	11,0
		9,5	5,1	6,5
		13,3	6,0	6,7
		$M \pm m$ 11,75 ± 0,32	10,24 ± 1,63	8,69 ± 1,1
		$p < 0,05$	< 0,05	< 0,05

о том, что в тех же условиях поражения печени антигепатоцитотоксической сывороткой происходит увеличение предшественников антителообразующих клеток — В-розеткообразующих — в лимфоидной фракции печени крыс.

В последнее время внимание исследователей привлекают вопросы клеточных коопераций в иммунном ответе при различных патологических состояниях. Известно, что Т-клетки принимают участие в иммунном ответе, являясь вспомогательными клетками при дифференциации В-клеток в антителообразующие [13, 14, 18], но могут быть и супрессорами иммунного ответа [19, 20]; они являются клетками, распознающими антигенную информацию. В этом плане представляет интерес изучение содержания Т- и В-клеток при патологии печени. По данным Тареева [11], у больных хронически активным гепатитом содержание Т-лимфоцитов в печени значительно превышало наблюдаемое у доноров, в то время как их количество в крови было ниже, чем у доноров. Это свидетельствует о том, что патология печени различной этиологии на определенных этапах приводит к увеличению Т-клеток. Поскольку в наших опытах увеличение Т-клеток наблюдалось в более поздние сроки, т. е. к 30 сут после последнего введения АГЦС, то вопрос о том, связано это с восстановительными процессами в печени или с развитием патологического процесса, требует дальнейшего разрешения.

## Литература

1. Алексеева I. М. Зміни білкового складу та активності трансаміназ сироватки крові і печінки шурів під впливом великих доз антигепатоцитотоксичної сироватки та АЦС.— Фізіол. журн. АН УРСР, 1968, 14, № 6, с. 774—781.
2. Алексеева И. Н. Влияние антигепатоцитотоксической сыворотки на экскреторную функцию печени.— Патол. физиол. и эксперим. терапия, 1973, № 2, с. 72—74.
3. Алексеева I. М. Жовчовидільна функція печінки в умовах застосування великих і малих доз антигепатоцитотоксичної сироватки.— Фізіол. журн. АН УРСР, 1974, 20, № 5, с. 602—607.
4. Алексеева I. М. Вміст розеткоутворююваних клітин в лімфоїдних органах шурів в умовах експериментального ураження печінки.— Фізіол. журн. АН УРСР, 1977, 23, № 6, с. 764—770.
5. Безпрозванный Б. К., Доронин П. П., Васильева Э. Н., Салиев Ф. Ш. Электронно-микроскопическое изучение измененной печеночных клеток крысы в процессе внешней секреции после прекращения изменения печеночно-кишечной циркуляции компонентов желчи.— Физиол. журн. СССР, 1973, № 10, с. 1582—1589.
6. Евнин Д. Н., Равич-Щербо М. И. О стимуляции образования антител в условиях интенсивной регенерации печени после частичной резекции.— В кн.: Программные материалы 41 Научной сессии Курского мед. ин-та, Курск, 1970, с. 51—55.
7. Золотникова Г. П. К вопросу о выявлении антителопродуцирующих клеток печени.— В кн.: Программ. матер. 41 Науч. сессии Курского мед. ин-та, Курск, 1970, с. 63—65.
8. Ильчевич Н. В., Антоненко Л. И. Клеточные и гуморальные показатели антителогенеза у крыс при поражении печени антигепатоцитотоксической сывороткой.— ЖМЭИ, 1977, № 9, с. 81—86.
9. Равич-Щербо М. И., Прокопенко П. Г. О включении печени в иммуногенез при острой лучевой болезни.— Радиобиология, 1966, № 6, с. 921—924.
10. Равич-Щербо М. И., Золотникова Г. П. Некоторые данные об иммунокомпетентных свойствах печени.— В кн.: Программные материалы 41 Научной сессии Курского мед. ин-та, Курск, 1970, с. 116—120.
11. Тареев Е. М. Проблема гепатитов и циррозов в современной клинике.— Сов. медицина, 1977, № 12, с. 3—14.
12. Bianco C., Patric R., Nussenzweig V. A population of lymphocytes, bearing the membrane receptors for antigenantibodycomplement complexes.— J. Exp. Med., 1970, 132, N 4, p. 702—720.
13. 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.
14. Marx J. L. Thymic hormones: Inducers of T cell maturation.— Science, 1975, 187, N 4182, p. 1183—1185.
15. Munthe-Kaas A. C., Berg T., Seglen P., Seljelid R. Mass isolation and culture of rat Kupffer cells.— J. Exp. Med., 1975, 144, N 1, p. 141.
16. Rous P., Beard J. M. Selection with the magnet and cultivation of reticuloendothelial cells (Kupffer cells).— J. Exp. Med., 1934, 59, p. 577.
17. Robinson J. H., Letratanakul G. A. Detection and quantitation of T and B-lymphocytes.— J. Immunol. Methods, 1975, 8, pt. 1/2, p. 53—60.
18. Sheares G. M., Weinstein G., Melmon K. L. Enhancement of immune response potential of mouse lymphoid cells fractionated over insolubilized conjugated histamine columns.— J. Immunol., 1974, 113, N 2, p. 597—607.
19. 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.
20. Tada T., Takemori T. Selective role of thymus-derived lymphocytes in the antibody response. I. Differential suppressive effect of carrier primed T cells on hapten-specific IgM and IgC antibody responses.— J. Exp. Med., 1974, 140, N 1, p. 239—252.

Отдел иммунологии и цитотоксических  
сывороток Института физиологии  
им. А. А. Богомольца АН УССР, Киев

Поступила в редакцию  
9.II 1978 г.

N. V. Il'chevich, Ju. G. Timoshenko

CONTENT OF ROSETTE FORMING CELLS IN LYMPHOID FRACTION  
OF LIVER CELLS WHEN APPLYING AGCS

Summary

The content of T-rosette forming cells in the lymphoid fraction of the rat liver after five daily administration of AGCS increases significantly by the 30th day after the last administration of AGCS as compared to their content in intact rats. The content of B-rosette forming cells in rats increases in all periods of the studies.