

УДК 612.017.1:616.36—002

И. Н. Алексеева, Ю. Г. Тимошенко

СОДЕРЖАНИЕ РОЗЕТКООБРАЗУЮЩИХ КЛЕТОК В СЕЛЕЗЕНКЕ И ТИМУСЕ КРЫС ПРИ РАЗЛИЧНОМ ФУНКЦИОНАЛЬНОМ СОСТОЯНИИ ПЕЧЕНИ

При всем многообразии литературных данных о том, что поражение печени сопровождается нарушением иммунного статуса организма, в частности изменением реакций на негепатогенные антигены, сведения эти в значительной степени противоречивы. С одной стороны, показано, что токсическое поражение печени кроликов четыреххлористым углеродом приводит к усилению антителогенеза на эритроциты барана и сывороточные белки [8]. С другой стороны, есть данные о том, что поражение печени большими дозами антигепатоцитотоксической сыворотки снижает антителогенез на эритроциты барана, что выражается в уменьшении титра гемолизинов и гемагглютининов в сыворотке, количества антителообразующих клеток в селезенке в лимфоузлах [6]. Установлено также, что поражение печени четыреххлористым углеродом у морских свинок приводит к снижению резистентности к дизентерийной инфекции [4]. Наши предыдущие исследования [3] показали, что поражение печени у крыс четыреххлористым углеродом или большими дозами антигепатоцитотоксической сыворотки приводит к уменьшению в лимфоидных органах количества лимфоцитов, образующих спонтанные розетки с эритроцитами барана (*E*-розеток), обеднению тимуса клетками. Выраженность этих изменений связана со степенью нарушений функций печени. Интересно выяснить, как отражается улучшение функций печени на показателях иммунитета.

Установлено, что антигепатоцитотоксическая сыворотка, примененная в малых дозах на фоне поражения печени четыреххлористым углеродом или экзогенными желчными кислотами, в значительной степени нормализует функции печени [1, 3, 5].

Мы изучали некоторые показатели иммунитета у крыс при различном функциональном состоянии печени: в норме, при применении четыреххлористого углерода (CCl_4) и при введении малых доз антигепатоцитотоксической сыворотки (АГЦС) после применения CCl_4 .

В качестве показателей иммунитета определено количество *E*- и *EAC*-розеткообразующих клеток в тимусе и селезенке, количество клеток в этих органах и их вес. Лимфоциты человека и животных, образующие *EAC*-розетки с эритроцитами барана (ЭБ), относятся к *B*-лимфоцитам — предшественникам антителообразующих клеток [7, 10, 11]. Для человеческих лимфоцитов, образующих спонтанные розетки с ЭБ (*E*-розетки), установлена принадлежность к *T*-лимфоцитам [10]. Лимфоциты крыс, образующие спонтанные розетки с ЭБ, могут рассматриваться как антигенсвязывающие клетки. Принадлежность их к тому или другому виду лимфоцитов в настоящее время точно не установлена.

Методика исследований

В суспензии клеток тимуса и селезенки определяли два вида розеткообразующих клеток: I — клетки, образующие розетки с 0,5% интактными эритроцитами барана — E-розетки, II — клетки, образующие розетки с 0,5% эритроцитами барана, нагруженными гемолизином и мышьяным комплементом — EAC-розетки [2]. К 0,1 мл суспензии клеток селезенки или тимуса, содержащей $2 \cdot 10^{-5}$ клеток, прибавляли 0,1 мл ЭБ. Смесь выдерживали 5 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали 5 мин при 200 g. При определении EAC-розеток смесь сразу же ресуспендировали и подсчитывали количество розеток в камере Горяева. При определении E-розеток смесь после центрифугирования выдерживали 1 ч при 4° С, затем ресуспендировали и подсчитывали количество розеток. Розеткой считали клетку, присоединившую четыре и более эритроцитов. Рассчитывали также общее количество клеток в органе (тимусе и селезенке).

В первой серии опытов крысам трехкратно, с интервалом в два дня вводили 0,25 мл/100 г CCl_4 при разведении 1:1 подсолнечным маслом, под кожу. Во второй серии опытов крысам после трехкратного введения CCl_4 , начиная со следующего дня, внутривенно через каждые два дня вводили гамма-глобулиновую фракцию антигепатоцитотоксической сыворотки (γ -АГЦС) в дозе 0,06 мкг белка на 100 г веса на одно введение. Титр АГЦС в реакции связывания комплемента был 1:200 — 1:320. В третьей серии опытов крысам после трехкратного введения CCl_4 вводили гамма-глобулиновую фракцию нормальной крольччьей сыворотки (γ -НКС). Дозы и схема введения такие же, как и при введении γ -АГЦС. Исследования проведены на 1, 4, 8, 18 сут после последнего введения сывороток. Эти сроки соответствовали 8, 11, 15, 25 сут после последнего введения CCl_4 . Интактные крысы служили контролем. Опыты проведены на 76 крысах. Результаты обработаны статистически с применением критерия Стьюдента.

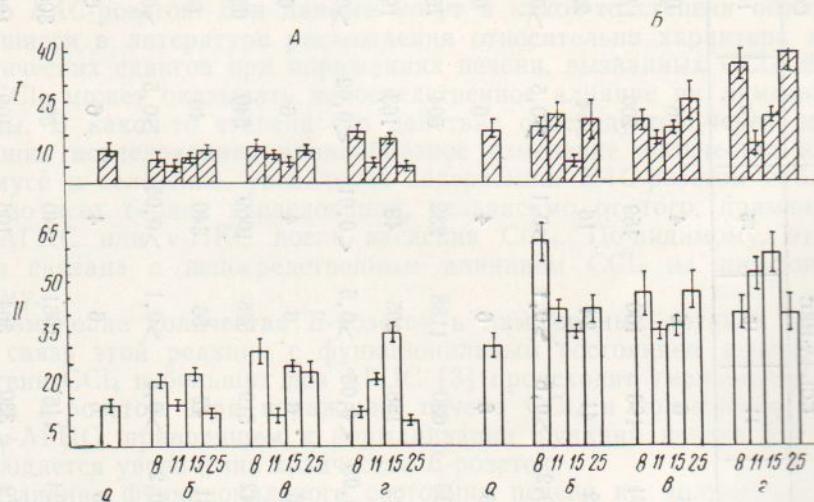
Результаты исследований и их обсуждение

Применение CCl_4 привело к увеличению количества EAC-розеток в селезенке и тимусе (см. рисунок). Это увеличение наблюдалось во всех трех сериях исследований. В селезенке при введении одного CCl_4 максимум увеличения EAC-розеток приходился на восьмые сутки. Количество EAC-розеток в 2,2 раза превысило их уровень в контроле ($p < 0,01$). В серии опытов с введением γ -НКС после CCl_4 максимальное увеличение числа EAC-розеток также приходилось на восьмые сутки после последнего введения CCl_4 , количество их составило 156% от уровня, наблюдаемого в контроле ($p < 0,05$). В опытах с введением γ -АГЦС после CCl_4 максимальное увеличение числа EAC-розеток наблюдалось на 15 сут после последнего введения CCl_4 . Их количество в два раза превысило контрольный уровень ($p < 0,02$). В тимусе увеличение количества EAC-розеток более выражено в опытах с введением γ -АГЦС и γ -НКС после CCl_4 . Максимум увеличения EAC-розеток в серии опытов с введением γ -АГЦС после CCl_4 приходился на 15 сут после последнего введения CCl_4 . Число EAC-розеток в три раза превысило исходный уровень ($p < 0,001$). В серии опытов с введением γ -НКС после CCl_4 максимум увеличения EAC-розеток наблюдался на восьмые сутки. Количество EAC-розеток составляло 250% от уровня, наблюдаемого в контроле ($p < 0,01$). В опытах с введением одного CCl_4 максимум увеличения EAC-розеток приходился на 15 сут, их количество составило 185% от уровня, зарегистрированного в контроле ($p \leq 0,05$).

Применение одного CCl_4 вызвало существенное уменьшение количества E-розеток в селезенке. На 15 сут это уменьшение было статистически достоверным ($p < 0,02$). Содержание E-розеток в тимусе под влиянием одного CCl_4 существенно не изменилось. В серии опытов с введением γ -НКС после CCl_4 в тимусе на 15 сут наблюдалось снижение числа E-розеток ($p < 0,05$). Применение γ -АГЦС после CCl_4 , в отличие от действия одного CCl_4 и действия γ -НКС на фоне CCl_4 , вызывало существенное увеличение количества E-розеток в селезенке.

На восьмые сутки количество *E*-розеток в селезенке превысило исходный уровень в 2,2 раза ($p < 0,02$), а на 25 сут — в 2,3 раза ($p < 0,05$). В тимусе содержание *E*-розеток при применении γ -АГЦС менялось волнообразно: на восьмые сутки их число в 1,8 раза превысило контрольный уровень, на 11 сут статистически достоверно понизилось, на 15 сут вновь превысило исходный уровень в 1,5 раза, а на 25 сутки понизилось, составив 40% от уровня в контроле.

Анализ изменения количества клеток в тимусе и селезенке (см. таблицу) показал, что применение CCl_4 во всех сериях опытов



Содержание *E*- и *EAC*-розеткообразующих клеток в тимусе и селезенке крыс при введении γ -АГЦС и γ -НКС после применения CCl_4 .

I — *E*-розетки, II — *EAC*-розетки; A — тимус, B — селезенка; a — контроль, б — CCl_4 , в — $CCl_4 + \gamma$ -НКС, г — $CCl_4 + \gamma$ -АГЦС. По вертикали — количество розеткообразующих клеток в %, по горизонтали — сутки после последнего введения CCl_4 .

уменьшает количество клеток в этих органах. Наблюдалась четко выраженная волнообразность изменения количества клеток в тимусе и селезенке. В тимусе уменьшение количества клеток во всех сериях происходило на 8 и 25 сут, а на 11 и 15 сут наблюдалось их увеличение, но не до уровня, наблюдаемого в контроле. Вес тимуса существенно не менялся во всех сериях исследований.

Вес селезенки во всех сериях увеличивался. На 25 сут после последнего введения CCl_4 наблюдалось максимальное увеличение веса. Наиболее выражено это увеличение было в серии исследований с введением γ -АГЦС после CCl_4 — в 2,4 раза ($p < 0,05$), несколько менее выраженное — при введении γ -НКС — в 2,1 раза ($p < 0,05$), еще менее выраженное при действии одного CCl_4 — в 1,7 раза ($p < 0,05$).

Суммируя полученные данные, можно сказать, что применение CCl_4 оказывает существенное влияние на лимфоидные органы. Примененная в данном исследовании доза CCl_4 вызывала дисфункцию тимуса и селезенки. С одной стороны, наблюдалось уменьшение количества клеток в обоих органах и снижение количества *E*-розеток в селезенке. С другой стороны, обнаружено увеличение количества предшественников антителообразующих клеток — *B*-розеткообразующих лимфоцитов — *EAC*-розеток. На снижение функций лимфоидных органов при действии CCl_4 , в частности — снижение веса тимуса, количества клеток в нем, митотического индекса указывают и другие исследова-

Вес тимуса и селезенки крыс и общее количество клеток в них при применении малых доз γ -АГПС и γ -НКС после трехкратного введения CCl_4

Орган	Изучаемые показатели	Статистические показатели	Контроль	Сутки после последнего введения							
				CCl_4				$CCl_4 + \gamma\text{-НКС}$			
				8	11	15	25	8	11	15	25
Тимус	Вес, в мг	n	10	6	6	4	6	6	4	6	6
	M	210	258	237	279	233	171	196	160	159	200
	$\pm m$	13	25	30	32	15	22	41	24	16	54
	p		>0,1	>0,2	>0,05	>0,2	=0,2	>0,5	>0,1	>0,1	>0,5
Количеств во клеток, $\times 10^6$	n	10	6	6	4	6	6	4	6	6	6
	M	1216	270	773	1147	352	535	630	1188	232	504
	$\pm m$	132	54	256	430	67	22	158	395	48	163
	p		<0,001	>0,1	>0,5	<0,02	<0,05	<0,05	>0,5	<0,01	<0,02
Селе- зенка	Вес, в мг	n	10	6	6	4	6	6	4	6	>0,1
	M	496	649	629	587	831	542	519	528	1069	540
	$\pm m$	35	50	38	56	180	41	47	56	340	48
	p		=0,05	>0,05	>0,2	>0,05	>0,2	>0,5	>0,1	>0,05	>0,5
Количеств во клеток, $\times 10^6$	n	10	5	6	4	5	6	6	4	6	<0,01
	M	1926	238	1535	416	506	524	1167	1961	540	590
	$\pm m$	356	25	708	86	49	79	330	304	106	109
	p		<0,02	>0,5	<0,02	>0,05	<0,05	>0,1	>0,5	<0,05	>0,2

ния [9]. Сопоставление данных об изменении показателей иммунитета, в частности содержания *E* и *EAC*-розеток в лимфоидных органах, под влиянием CCl_4 в данной работе и в наших предыдущих исследованиях [3], где при одинаковой схеме введения мы применили CCl_4 в два раза большей дозе, говорит о том, что от дозы яда зависит характер иммунологических сдвигов в организме. Большая доза CCl_4 приводит к уменьшению количества *E*-розеток и не влияет на количество *EAC*-розеток, в два раза меньшая доза CCl_4 , оказывая некоторое угнетающее действие на *E*-розеткообразование, увеличивает количество *EAC*-розеток. Эти данные могут в какой-то степени объяснить имеющиеся в литературе расхождения относительно характера иммунологических сдвигов при поражениях печени, вызванных CCl_4 . Введение CCl_4 может оказывать непосредственное влияние на лимфоидные органы. В какой-то степени его действие опосредуется через печень. В наших исследованиях военнообразное изменение количества клеток в тимусе и селезенке, увеличение содержания *EAC*-розеток наблюдалось во всех сериях исследований, независимо от того, применялась ли γ -АГЦС или ν -НКС после введения CCl_4 . По-видимому, эта реакция связана с непосредственным влиянием CCl_4 на лимфоидную систему.

Изменение количества *E*-розеток в лимфоидных органах показывает связь этой реакции с функциональным состоянием печени. При действии CCl_4 и больших доз АГЦС [3] происходит уменьшение количества *E*-розеток. При поражении печени CCl_4 и применении малых доз γ -АГЦС, приводящем к нормализации функций печени [1, 2, 3], наблюдается увеличение количества *E*-розеток.

Влияние функционального состояния печени на количество *E*-розеткообразующих клеток в лимфоидных органах крыс, по-видимому, связано с изменением метаболизма в печени веществ, участвующих в созревании этих клеток.

Вопрос этот требует дальнейшего изучения.

Л и т е р а т у р а

1. Алексеева I. M., Касatkina M. Г., Бризгина T. M. Вплив антигепатоцитотоксичної сироватки на функціональний стан печінки при її ураженні екзогенними жовчними кислотами.—Фізiol. журн. АН УССР, 1976, 22, № 5, с. 604—609.
2. Алексеева I. N. О регуляции функций печени с помощью антигепатоцитотоксической сыворотки.—В кн.: Фундаментальные проблемы гастроэнтерологии. Львов, 1977, с. 145—146.
3. Алексеева I. M. Вміст розеткоутворювальних клітин в лімфоїдних органах щурів в умовах експериментального ураження печінки.—Фізiol. журн. АН УРСР, 1977, 23, № 6, с. 764—770.
4. Астахова B. C. Особенности течения дизентерии Зоне на фоне панкреатита и гепатита: Автoref. канд. дис.—К., 1976.—23 с.
5. Галенко T. I. Исследование действия антигепатоцитотоксической сыворотки на активность ферментов в печени и сыворотке крови: Автoref. канд. дис.—К., 1977.—16 с.
6. Ильчевич H. B., Антоненко L. I. Клеточные и гуморальные показатели антителогенеза у крыс при поражении печени антигепатоцитотоксической сывороткой.—Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол., 1977, № 9, с. 81—86.
7. Петров P. B., Иммунология и иммуногенетика.—М.: Медицина, 1976.—333 с.
8. Прокопенко L. Г., Кедровская H. H. Гуморальные факторы стимуляции иммуногенеза при токсическом поражении печени.—Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунол., 1976, № 6, с. 57—62.
9. Редькина E. K., Овакимов B. Г. Реакция лимфоидной ткани при интоксикации CCl_4 —Патол. физиол. и эксперим. терапия, 1977, № 2, с. 43—48.
10. Birnbaum G. Numbers of rosette forming cells in human peripheral blood.—Cell. Immunol., 1976, 21, N 2, p. 371—378.

11. Franceschi C., Perucco P., Poalucci 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.
12. Robinson J. A., Letratanakul G. A. Detection and Quantitation of T- and B- lymphocytes.—J. Immunol. Methods, 1975, 8, N 1/2, p. 53—60.

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

Поступила в редакцию
9.III 1978 г.

I. N. Alekseeva, Yu. G. Timoshenko

CONTENT OF ROSETTE-FORMING CELLS IN THE RAT THYMUS
AND SPLEEN UNDER CONDITIONS OF DIFFERENT
FUNCTIONAL STATE OF THE LIVER

Summary

A three-fold introduction of carbontetrachloride in a dose of 0.25 ml/100 g of diluted with oil (1:1) is accompanied by a decrease in the number of cells forming E-rosettes with sheep erythrocytes, by an increase in the number of cell forming EAC-rosettes with sheep erythrocytes and by a decrease in the total number of cells in the thymus and spleen. Normalization of the liver functions by small doses of a gamma-globulin fraction of antihepatocytotoxic serum is accompanied by an increase in the number of E-rosette forming cells in rat lymphoid organs.

Department of Immunology and Cytotoxic Sera A. A. Bogomoletz Institute of Physiology, Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev