

- клетин аденогипофизу щурів до факторів гіпоталамічної регуляції // Доп. АН УРСР. Сер. Б.— 1982.— № 1.— С. 69—71.
5. Arner P., Bolinder J., Wennlund A., Östman J. Influence of thyroid hormone level on insulin action in human adipose tissue // Diabetes.— 1984.—33, N 4.— P. 369—375.
 6. Bolinder J., Engfeldt P., Östman J., Arner P. Site differences in insulin receptor binding and insulin action in subcutaneous fat of obese females // J. Clin. Endocrinol. and Metabol.— 1983.—57, N 3.— P. 455—461.
 7. Cech J. M., Amatruda J. M. The effect of triiodothyronine on insulin binding and action in rat adipocytes // Hormone and Metab. Res.— 1983.—15, N 11.— P. 530—532.
 8. Czech M. P., Malbon C. C., Kerman K. et al. Effect of thyroid status on insulin action in rat adipocytes and skeletal muscle // J. Clin. Invest.— 1980.—6, N 3.— P. 574—582.
 9. Dmitriadis G., Baker B., Marsh H. et al. Effect of thyroid hormone excess on action, secretion, and metabolism of insulin in humans // Amer. J. Physiol.— 1985.—248, N 5.— P. E593—E601.
 10. Emmelot P., Bos C. J. Studies on plasma membranes. III. Mg^{2+} -ATPase, (Na^+ , K^+ , Mg^{2+})-ATPase and 5'-nucleotidase activity of plasma membranes isolated from rat liver // Biochim. et biophys. acta.— 1966.— 120, N 3.— P. 369—382.
 11. Fantus I. G., Ryan J., Hizaka A., Gorden P. The effect of glucocorticoids on the insulin receptor: an in vivo and in vitro study // J. Clin. Endocrinol. and Metabol.— 1981.—52, N 5.— P. 953—960.
 12. Heise E., Joost H. J., Hasseblatt A. Insulin binding and response to insulin of adipocytes from thyroxine treated rats // Endocrinology.— 1982.—110, N 3.— P. 955—960.
 13. Kobayashi M., Meck J. C. Increased insulin binding to circulating monocyte insulin receptors in hyperthyroid patients // Diabetes.— 1976.—25, Suppl. 1.— P. 299.
 14. Kobayashi M., Olefsky J. M. Effect of experimental hyperinsulinemia on insulin binding and glucose transport in isolated rat adipocytes // Amer. J. Physiol.— 1978.—235, N 1.— P. E53—E62.
 15. Laville M., Riou J. P., Bougneris P. F. et al. Glucose metabolism in experimental hyperthyroidism: intact in vivo sensitivity to insulin with abnormal binding and increased glucose turnover // J. Clin. Endocrinol. and Metabol.— 1984.—58, N 6.— P. 960—965.
 16. Lowry O. H., Rosenbrough N. F., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.— 1951.—193, N 1.— P. 265—275.
 17. Meyts P. de, Roth J. Cooperativity in ligand binding: a new graphic analysis // Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1975.—66, N 8.— P. 1118—1126.
 18. Ruyter H. de, Burman K. D., Wartofsky L., Taylor S. I. Effects of thyroid hormone on the insulin receptor in rat liver membranes // Endocrinology.— 1982.—110, N 6.— P. 1922—1925.
 19. Scatchard L. The attractions of protein for small molecules and ions // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1949.—51, N 6.— P. 660—672.
 20. Scherthaner G., Prager R., Weissel M., Höfer R. Decreased insulin receptor binding in hyperthyroidism // Klin. Wochenschrift.— 1984.—62, N 10.— P. 1074—1080.
 21. Serman B. M., Ganguli S., Devaskar S., Sperling M. A. Hypothyroidism and glucocorticoids modulate the development of hepatic insulin receptor // Pediatr. Res.— 1983.—17, N 1.— P. 111—116.

Київ. Ин-т ендокринології та обміну речовин
М-ва здоров'я України УССР

Поступила 04.06.86

УДК 616.36—092:612.017.1

Влияние антител к цитохрому с на восстановительные процессы в печени и возможное участие в реализации их действия антиидиотипических антител

И. Н. Алексеева, А. И. Назаренко, С. И. Павлович, М. В. Скок

Стимулирующее действие малых доз антител, содержащихся в противораковых цитотоксических сыворотках, установлено в эксперименте и подтверждено применением лечебных препаратов, созданных на основе этих сывороток [5, 8]. Ранее мы показали, что противопеченочные антитела — γ -глобулиновая фракция антигепатотоксической сыворотки (γ -АГПС), примененные на фоне поражения печени четыреххлористым углеродом, стимулируют регенерацию печени и способ-

ствуют нормализации ее нарушенных функций [1, 2]. В объяснении механизмов стимулирующего действия цитотоксических сывороток важная роль отводится продуктам распада тканей органа [4]. Молекулярные механизмы действия противоорганных антител требуют дальнейшего изучения.

При повреждении клетки за ее пределы одним из первых выходит цитохром с — белок дыхательной цепи митохондрий, который обладает малой молекулярной массой и не является интегральным белком мембраны [3]. В сыворотке крови интактных животных и здоровых людей обнаруживаются антитела против цитохрома с [7, 10], которые, по-видимому, участвуют в его катаболизме. Антитела к цитохрому с могут влиять на тканевое дыхание печени.

Согласно современным представлениям, в организме существует динамическое равновесие нормальных и антиидиотипических антител (АИАТ). При иммунизациях и увеличении титров антител против антигена количество соответствующих АИАТ также возрастает. АИАТ, являясь в ряде случаев «внутренним образом» антигена, могут выполнять его биологические функции [13]. В условиях усиленного катаболизма продуктов тканевого распада, образующихся под влиянием антител, АИАТ могут выступать в качестве аналогов тканевых антигенов и таким образом способствовать восстановлению органа. Представляло интерес выяснить, сопровождается ли введение экзогенных антител изменением содержания АИАТ и связано ли это с восстановительными процессами. Эту задачу можно было решить лишь на модели антител против отдельного белка, т. е. антител с ограниченным набором идиотипов.

Исходя из этого, целью настоящей работы было установить характер влияния антител к цитохрому с на тканевое дыхание печени, пораженной CCl_4 , и ее гистоструктуру, а также определить при этом изменение содержания АИАТ.

Методика

Опыты проведены на 66 мышах линии СВА массой 18—20 г. Поражение печени вызвали трехкратным подкожным введением с интервалом в 2 сут 0,05 мл 50 %-ного масляного раствора CCl_4 на 10 г массы тела. На следующие сутки после последнего введения CCl_4 животным начинали вводить внутривенно антитела против цитохрома с (11 нг; 110 нг; 1,1 мкг; 11 мкг белка на 10 г массы тела) трехкратно с интервалом в 2 сут. Антитела против цитохрома с получали иммунизацией кроликов препаратом цитохрома с, полученного из миокарда лошади («Sigma»), как описано ранее [6]. Этот цитохром обладает перекрестной с цитохромом с мышши специфичностью и является органонеспецифическим [12]. В качестве контрольных препаратов использовали нормальные кроличьи иммуноглобулины (ИГ), полученные высаливанием 33 %-ным сульфатом аммония, иммуноглобулины, истощенные цитохромом с (ИГ-цитохром с), а также γ -АГПС, полученную, как описано ранее [2]. Выделение антител и истощение нормальных иммуноглобулинов проводили методом аффинной хроматографии на цитохроме с, конъюгированном с сефарозой 4В с помощью *p*-бензохинона [6]. Все препараты вводили в одинаковых по содержанию белка дозах. В различные сроки после введения препаратов животных забивали, определяли тканевое дыхание и гистоструктуру печени, а также содержание в сыворотке крови АИАТ и общих антииммуноглобулиновых антител. Тканевое дыхание печени оценивали по поглощению кислорода в аппарате Варбурга при температуре 37 °С и выражали в микролитрах поглощенного кислорода за один час в расчете на 1 мг сухой массы ткани. Для гистологических исследований кусочки печени (левой, медиальной и правой доли) фиксировали 10 %-ным нейтральным формалином, обрабатывали по общепринятой методике с заливкой в парафин и окраской гематоксилин-эозином и пикрофуксинном по ван Гизон. АИАТ и антииммуноглобулиновые антитела определяли методом сорбционного иммуоферментного анализа [7]. В лунках полистирольных плашек сорбировали кроличьи антитела против цитохрома с или γ -АГПС (1 мкг/мл), обрабатывали плашки исследуемыми сыворотками крови мышей в разведении 1:100, а затем конъюгатом кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши с пероксидазой и проявляли субстратом пероксидазы: 0,006 %-ным

раствором H_2O_2 с 3,7 миллимолярным раствором *o*-фенилендиамина (рН 6,0), после чего фотометрировали на колориметре Microelisa autoreader MR 590 фирмы «Dunattech» (Швейцария) при длине волны 490 нм. Относительное содержание антител выражали в единицах экстинкции. Для определения аффинности антител против цитохрома *c*, входящих в состав ИГ и γ -АГЦС, в лунки плашек с сорбированным цитохромом *c* вносили аффинно выделенные из иммунной кроличьей сыворотки антитела против цитохрома *c* или нормальные кроличьи ИГ, или γ -АГЦС в таких пропорциях, чтобы концентрация антител, способных связываться с цитохромом *c*, по данным аффинной хроматографии была одинакова. В этих условиях количество связавшихся на плашке антител зависело только от их аффинности, которая, таким образом, становилась пропорциональной конечному поглощению. Плашки проявляли с помощью конъюгата козьих антител против ИГ кролика с пероксидазой фирмы «Дакко» (Дания) и субстрата пероксидазы.

Результаты обработаны статистически с применением критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Показано, что антитела против цитохрома *c* стимулировали восстановление тканевого дыхания печени, нарушенного в результате применения CCl_4 . Была установлена доза антител, оказывающая максимальный стимулирующий эффект — 1,1 мкг белка на 10 г массы тела на одно введение. На 3-и — 7-е сутки после последнего введения тканевое дыхание печени, сниженное под влиянием CCl_4 , восстанавливалось на 29 % (таблица). ИГ и ИГ-цитохром *c* оказывали близкое по значению стимулирующее действие. Наибольший стимулирующий эффект оказывала γ -АГЦС: ее применение практически полностью нормализовало тканевое дыхание печени.

Тканевое дыхание печени мышей в условиях применения CCl_4 и введения препаратов антител, мкл $O_2 \cdot ч^{-1} \cdot мг^{-1}$ сухой массы

Статистический показатель	Контроль (К)	CCl_4	CCl_4 и препарат			
			антитела к цитохрому <i>c</i> (АЦ)	ИГ	ИГ-цитохром <i>c</i>	γ -АГЦС
n	12	14	16	5	5	3
M	5,7	3,8	4,9	4,9	5,2	5,6
$\pm m$	0,03	0,14	0,13	0,29	0,12	0,10
R_K		<0,001				
R_{CCl_4}			<0,001	<0,01	<0,001	<0,001
R_{AC}				>0,5	>0,1	<0,001

Гистологическое изучение печени мышей после трехкратного введения CCl_4 выявило паренхиматозную дистрофию различной выраженности: от умеренной (местами с потерей трабекулярного строения) до значительной (распространенного характера с переходом в некробиоз отдельных клеток и жировую инфильтрацию преимущественно периферических циркуляторных зон печеночных ацинусов). Наблюдалось расширение вокрусинусоидальных пространств и стаз капилляров, разрыхление сосудистых стенок с набуханием эндотелиоцитов. Введение антител к цитохрому *c* не оказывало существенного влияния на гистоструктуру печени, пораженной CCl_4 . ИГ и ИГ-цитохром *c* способствовали восстановлению трабекулярного строения печени, появлению гепатоцитов с нормальной структурой ядра и цитоплазмы, а также очагов регенерации с интенсивно окрашенными двуядерными гепатоцитами. Применение γ -АГЦС оказывало наиболее выраженное стимулирующее действие на развитие регенерации в печени и способствовало значительной нормализации ее гистоструктуры.

Таким образом, антитела против цитохрома *c* стимулировали тканевое дыхание печени, не оказывая существенного влияния на ее гистоструктуру, в то время как другие исследуемые препараты (γ -АГЦС, ИГ, ИГ-цитохром *c*), стимулируя тканевое дыхание, способствовали

также нормализации гистоструктуры печени. Вероятно, это связано с тем, что ИГ и особенно γ -АГЦС содержат набор антител ко многим антигенам печени и поэтому оказывают более выраженное действие на ее структуру и функции, а антитела против цитохрома *c* действуют лишь на звено тканевого дыхания, в котором важная роль принадлежит этому белку. Таким образом, действие антител против цитохрома *c* обусловлено их специфичностью, а не свойствами иных частей молекулы иммуноглобулина.

Далее в сыворотке крови опытных животных определяли АИАТ и общие антииммуноглобулиновые антитела. АИАТ, как известно [9], на-

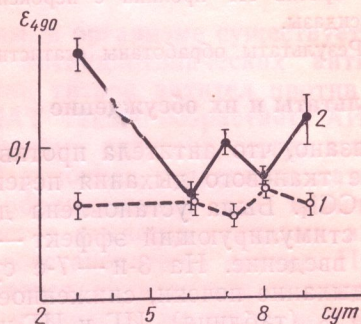
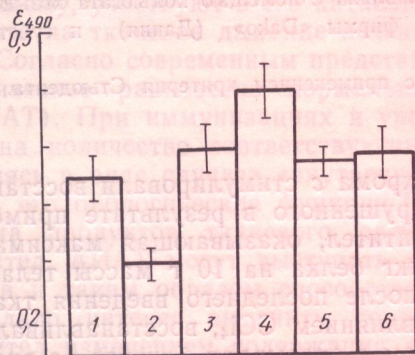


Рис. 1. Содержание антиидиотипических антител в сыворотках крови intactных (1) и пораженных CCl_4 (2) мышей, а также мышей, которым вводили антитела против цитохрома *c* (3), нормальные иммуноглобулины (4), иммуноглобулины, истощенные цитохромом *c* (5) и γ -АГЦС (6) на фоне применения CCl_4 ($P_{2-1} < 0,01$; $P_{3-2} < 0,01$).

Рис. 2. Содержание общих антииммуноглобулиновых антител в сыворотке крови контрольных животных (1) и животных, получавших только CCl_4 , а также CCl_4 в комплексе со всеми исследованными препаратами (2) в разные сроки после последнего введения антител.

правлены против детерминант, расположенных вблизи антигенсвязывающего центра антител, а общие антииммуноглобулиновые антитела узнают преимущественно детерминанты, не связанные со специфичностью антител. Для определения АИАТ мы использовали аффинно очищенные кроличьи антитела против цитохрома *c*, а для определения антииммуноглобулиновых антител — γ -АГЦС, содержащую набор антител разной специфичности. Было обнаружено, что в сыворотке крови intactных мышей содержится некоторое количество АИАТ, которое достоверно снижается при действии CCl_4 (рис. 1). Введение антител против цитохрома *c* (равно как и ИГ, ИГ-цитохром *c*, γ -АГЦС) приводило к восстановлению содержания АИАТ. ИГ-цитохром *c* меньше способствовали восстановлению содержания АИАТ, чем ИГ. Содержание общих антииммуноглобулиновых антител изменялось в динамике забора крови у животных (рис. 2). Максимальное значение содержания наблюдалось через 3 сут после введения антител, затем содержание снижалось и далее изменялось волнообразно. Такая динамика характерна вообще для поражения печени CCl_4 , независимо от введения любых антител. При введении мышам кроличьих антител против цитохрома *c* следовало ожидать появления у них как АИАТ, так и общих антииммуноглобулиновых антител. Представленные результаты свидетельствуют о том, что преимущественно меняется содержание АИАТ. Это еще раз подтверждает, что действие антител против цитохрома *c* определяется их специфичностью.

Результаты наших исследований показали наличие в γ -АГЦС и в препаратах ИГ антител, способных связываться с цитохромом *c*, что согласуется со способностью этих препаратов восстанавливать содержание АИАТ к цитохрому *c*. С цитохромом *c*, иммобилизованным на сефарозе 4В, связалось 32 % белка γ -АГЦС и 43 % ИГ. Сравнительное изучение аффинности этих антител к цитохрому *c* показало, что

следующее место после антител к цитохрому *c* (E_{490} составляет 0,381) занимали ИГ (E_{490} составляет 0,193), а далее антитела γ -АГЦС (E_{490} составляет 0,058). Это означает, что при иммунизации суммарными антигенами печени цитохром *c*, являясь слабым иммуногеном, не может конкурировать с высокомолекулярными антигенами, против которых и вырабатывается основная масса антител. Препарат антител против цитохрома *c* содержит антитела ограниченной специфичности, но сравнительно высокой аффинности; препарат ИГ — антитела практически неограниченной специфичности и средней аффинности, а γ -АГЦС характеризуется, по-видимому, большим разнообразием специфичностей при высоком родстве к печеночным антигенам, что и обуславливает ее высокую эффективность при введении в организм. Поскольку антитела к цитохрому *c* входят в состав γ -АГЦС и реализуют часть ее действия, их эффект может рассматриваться в качестве упрощенной модели действия γ -АГЦС. На этой модели с использованием антител ограниченного спектра идиотипов показано, что их восстановительное действие на тканевое дыхание сопровождается восстановлением содержания АИАТ, сниженного под влиянием CCl_4 . Это дает основание предполагать участие АИАТ в реализации стимулирующего действия антитканевых антител. Отражая структуру тканевых антигенов, АИАТ могут действовать подобно этим антигенам, но дольше оставаться в зоне поражения, минуя пути катаболизма, характерные для некротизирующейся ткани. Объединение в одной молекуле структурных свойств тканевых антигенов и эффекторных свойств иммуноглобулинов также, возможно, имеет биологическое значение для активации различных типов клеток и биохимических систем.

Суммируя полученные результаты, можно сделать следующее заключение. Введение животным антител против цитохрома *c* на фоне применения CCl_4 стимулирует восстановление тканевого дыхания печени. Действия этих антител можно рассматривать как частный случай эффекта противопеченочных антител. Стимулирующее действие антител обусловлено их специфичностью. Одним из механизмов их действия может быть индукция АИАТ, которые, являясь «внутренним образом» тканевых антигенов, замещают их в ходе восстановительных процессов в печени.

THE EFFECT OF ANTICYTOCHROME *c* ANTIBODIES ON THE LIVER RESTORATION AND THE POSSIBLE PARTICIPATION OF ANTIIDIOTYPIC ANTIBODIES IN REALIZATION OF THEIR ACTION

I. N. Alekseeva, A. I. Nazarenko, S. I. Pavlovich, M. V. Skok

The effect of anticytochrome *c* antibodies in small doses on the liver tissue respiration and histostructure and on the level of antiidiotypic antibodies in the sera of CCl_4 -treated mice was studied as compared with the effect of the gamma-globulin fraction of antihepatocytotoxic serum, normal immunoglobulins and immunoglobulins exhausted with cytochrome *c*. The three-fold injection of anticytochrome *c* antibodies (1.1 μ g of protein per 10 g of body weight) restored the tissue respiration by 29 % having no essential effect on the liver histostructure. The stimulating action of antibodies is induced by their specificity and is followed by an increase of antiidiotypic antibodies level in the serum decreased after the CCl_4 injection. The action of anticytochrome *c* antibodies is considered to be a particular case of the gamma-globulin fraction of the antihepatocytotoxic serum effect. The antiidiotypic antibodies are supposed to be involved in the restoration as the «internal images» of tissue antigens.

A. A. Bogomoletz Institute of Physiology, Academy of Sciences
of the Ukrainian SSR, Kiev
A. V. Palladin Institute of Biochemistry, Academy of Sciences
of the Ukrainian SSR, Kiev

1. Алексеева И. Н., Березовский В. А., Ильевич Н. В. и др. О влиянии функционального состояния печени на устойчивость крыс к острой гипоксии // Патол. физиология.— 1979.— Вып. 1.— С. 65—66.
2. Алексеева И. Н. Противопеченочные антитела и функции печени // Киев: Наук. думка.— 1980.—182 с.
3. Баласявичус Р. В., Толейкис А. И., Прамкявичус А. К. Изменения количественного состава цитохромов и функциональной активности митохондрий сердца при ишемии // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1984.— № 1.— С. 40—42.
4. Богомолец О. О. Специфічна цитотоксична стимуляція і блокада клітинних функцій // Мед. журн.— 1935.— Вып. 3/4.— С. 447—456.
5. Богомолец А. А. Антитрикулярная цитотоксическая сыворотка как средство патогенетической терапии // О лечебном действии антитрикулярной цитотоксической сыворотки (АЦС).— Уфа: Изд-во УССР.— 1942.— С. 9—29.
6. Комиссаренко С. В., Скок М. В., Васильева Г. А., Евстигнеева Р. П. Иммунохимический анализ цитохрома с лошади. Стехометрия взаимодействия и средство цитохрома с к специфическим Fab-фрагментам // Докл. АН УССР.— 1982.—264, № 3.— С. 752—755.
7. Скок М. В., Комиссаренко С. В. Изучение динамики и специфичности иммунного ответа мышей на цитохром с лошади методом сорбционного иммуоферментного анализа // Иммунология.— 1986.— № 3.— С. 20—23.
8. Спасокукоцкий Ю. А., Ильевич Н. В., Барченко Л. И. и др. Действие специфических цитотоксических сывороток на половые железы // Киев: Наук. думка.— 1977.— 216 с.
9. Brown J. C., Rodkey L. S. Autoregulation of antibody response via network-induced auto-anti-idiotypic // J. Exp. Med.— 1979.—150, N 1.— P. 67—72.
10. Gilbert B., Dighiero G., Avrameas S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. 1. Detection, isolation and characterization // J. Immunol.— 1982.—127, N 11.— P. 2779—2787.
11. Jerne N. K. Towards a network theory of the immune system // Ann. Immunol. (Paris).— 1974.—125, N 2.— P. 373—375.
12. Reichlin M., Fogel S., Nisonoff A., Margoliash E. Antibodies against cytochromes c from vertebrates // J. Biol. Chem.— 1962.—241, N 1.— P. 251—253.
13. Weissberger H. F., Shenk R. R., Dickler H. B. Anti-idiotypic stimulation of antigen-specific antigen-independent antibody responses in vitro. 1. Evidence for stimulation of helper T-lymphocyte function // J. Exp. Med.— 1985.—158, N 4.— P. 465—475.

Ин-т физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев;
Ин-т биохимии им. А. В. Палладина
АН УССР, Киев

Поступила 21.11.86

УДК 612.181:612.26

Особенности тканевого дыхания артериальных и венозных сосудов

А. В. Атаман

Потребление кислорода стенкой кровеносных сосудов является одним из наиболее важных интегральных показателей энергетического обмена сосудистой стенки. Интенсивность потребления кислорода косвенным образом отражает интенсивность энергозависимых процессов, протекающих в гладкомышечных и эндотелиальных клетках сосудов в условиях нормы и в условиях действия повреждающих факторов.

Известно, что венозные сосуды в отличие от артериальных обладают высокой устойчивостью к действию целого ряда патогенных агентов [6, 9, 15]. В связи с этим представляет интерес изучение исходных различий окислительной способности артериальной и венозной ткани. Эти различия, по-видимому, могут быть одним из факторов, предопределяющих разную чувствительность артерий и вен к действию одних и тех же патогенных факторов.

Методика

Опыты выполнены на 23 кроликах разного пола в возрасте 6—8 мес. Животных умерщвляли с помощью воздушной эмболии. Объектом исследования служили спиральные полоски (длина 35, ширина 5 мм) грудной и брюшной аорты, общей сонной и