

13. Tweed W. A., Cote J., Rash M., Loh H. Arterial oxygenation determines autoregulation of cerebral blood flow in the fetal lamb // *Pediatr. Res.*—1983.—17, N 4.—P. 246—249.
14. Wagerle L. C., Hefferman T. M., Sacks L. M., Delivoria-Papadopoulos. Sympathetic effect on cerebral blood flow regulation in hypoxic newborn lambs // *Amer. J. Physiol.*—1983.—245, N 3.—P. H487—H494.

Оренбург. мед. ин-т

Материал поступил в редакцию 10.11.87

М-ва здравоохранения РСФСР

УДК 612.412.414:612.35—018

В. В. Корпачев, Д. С. Онищенко

Стимулирующий эффект биологически активных веществ селезенки на функциональную активность гепатоцитов

Работами отечественных и зарубежных исследователей установлено, что в селезенке содержатся различные биологически активные факторы, стимулирующие функцию печени [3, 4, 6, 10]. Было показано, что фармакопейный препарат селезенки — спленин повышает обезвреживающую и экскреторно-поглодательную функцию при экспериментальном токсическом гепатите [7—9] и оказывает положительный терапевтический эффект при целом ряде заболеваний печени [1, 2]. Однако химическая природа веществ селезенки и гепатотропный механизм их действия изучены еще недостаточно. Цель настоящей работы — установить, способны ли гуморальные факторы селезенки оказывать непосредственное влияние на гепатоциты или эффект реализуется через воздействие на нервную, иммунную или эндокринную системы, а также есть ли взаимосвязь активности экстрактов селезенки и способа их получения.

Методика

Однослойную культуру клеток печени готовили из печени 12—14-суточных куриных эмбрионов. Полученный материал до обработки хранили в холодильнике в питательной среде 199 при +4°C. После 2—3-кратного отмывания печени раствором Хенкса ее измельчали глазными ножницами до фрагментов размером 0,5—1,0 мм, которые также отмывали раствором Хенкса до получения прозрачной жидкости. Ферментативное разделение клеток проводили 0,25 %-ным раствором трипсина на магнитной мешалке при температуре водяной бани 32—34°C. Через 15—20 мин отдельные порции надосадочной жидкости с отделившимися клетками собирали во флакон вместимостью 250 мл и хранили в холодильнике. Время полной дезагрегации ткани составляло 1 ч. Для удаления трипсина объединенные порции клеточной суспензии центрифугировали в течение 15 мин при 1 000 мин⁻¹. Надосадочную жидкость сливали, осадок тщательно промывали питательной средой 199 (150 мл) и повторно центрифугировали в том же режиме. После удаления надосадочной жидкости осадок клеток ресуспендировали в питательной среде, состоящей из смеси (равное соотношение) среды 199 и 0,5 %-ного гидролиза лактальбумина с добавлением инактивированной бычьей сыворотки (15 % объема). В каждую пробирку высевали клетки из расчета 1,2—1,4·10⁵ клеток на 1 мл питательной среды.

С целью удобства приготовления препаратов для морфологического и гистохимического исследования в пробирку помещали кусочки измельченной до 0,5—2 см слюды. Первую смену питательной среды необходимо произвести через сутки. В дальнейшем — через каждые 3 сут роста. Ежедневно культуру просматривали под малым увеличением микроскопа. Фрагменты культуры, выросшей на кусочках слюды, фиксировали 96 %-ным этанолом и окрашивали гематоксилин-эозином. Гистохимически определяли глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу. В часть пробирок вносили фармакопейный препарат спленин и полученный нами безбелковый экстракт селезенки [5] разной концентрации

(0,01; 0,001 и 0,0001 мл на 1 мл питательной среды). По динамике морфологической картины, митотического индекса и активности фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в клетках культуры судили об эффективности действия указанных препаратов. Учет результатов проводили через 24 и 48 ч воздействия.

Результаты и их обсуждение

На 4—5-е сутки роста в монослое культуры обнаруживается несколько видов клеток, большинство из которых составляют эпителиальные клетки и фибробласты. Эпителиальные клетки, отнесенные нами к гепатоцитам, растут островками. Клетки имеют полигональную форму, плотно

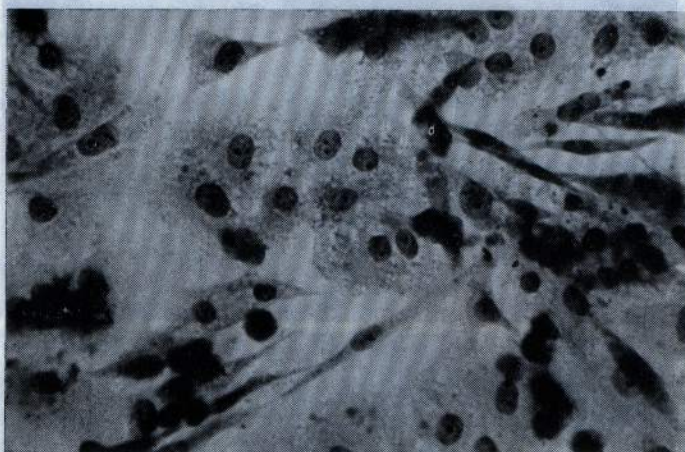


Рис. 1. Однослойная клеточная культура печени куриных эмбрионов в норме на 5-е сутки роста. Окраска гематоксином-эозином. $\times 200$.

прилегают друг к другу, границы между ними четко контурированы. По размерам их можно разделить на 3 типа: большие, средние и малые. Последние располагаются в центре островков роста. Ядра в этих клетках круглые, гиперхромные, с одним-двумя ядрышками, цитоплазма компактная. Для гепатоцитов среднего размера характерны более светлые ядра и разрыхленная цитоплазма. Большие гепатоциты располагались менее плотно по периферии островков. В свободных промежутках, между островками гепатоцитов, в виде тяжей расположены фибробласты (рис. 1).

При добавлении спленина в концентрации 0,01 и 0,001 мл на 1 мл питательной среды обнаружен стимулирующий эффект на гепатоциты. При этом в них наблюдается увеличение ядрышек, ядра и цитоплазмы. Она просветляется, в ней появляются мелкие вакуоли (вероятно, накопление гликогена). Увеличивается митотический индекс гепатоцитов, особенно гепатоцитов среднего размера. Так, если в контрольных культурах насчитывалось 15—18 митозов на 1000 клеток, то в опытных — 22—48 митозов. Спленин в указанных концентрациях вызывает повышение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. При концентрации препарата 0,0001 мл изменений морфологии гепатоцитов и активности исследуемого фермента не обнаружено.

Спленин в концентрации 0,01 и 0,001 мл на 1 мл питательной среды отчетливо угнетает размножение и рост фибробластов. Митотический индекс этих клеток падает в 2—3 раза, резко снижается активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, абсолютное число фибробластов через 24 ч после воздействия спленином становится в 1,5 раза меньше по сравнению с контрольными препаратами. Через 48 ч этот показатель уменьшается в 2,5—4 раза.

При исследовании влияния безбелкового экстракта селезенки в концентрации 0,001 и 0,0001 мл на 1 мл питательной среды также наблю-

дается выраженный стимулирующий эффект на гепатоциты. Фибробласты при этом остаются интактными. Стимулирующий эффект особенно выражен при концентрации экстракта 0,0001 мл (рис. 2, а). Морфологические и гистохимические изменения, повышение митотического индекса подобны картине, наблюдаемой при воздействии спленином. Преимущественно происходит стимуляция гепатоцитов среднего и большого

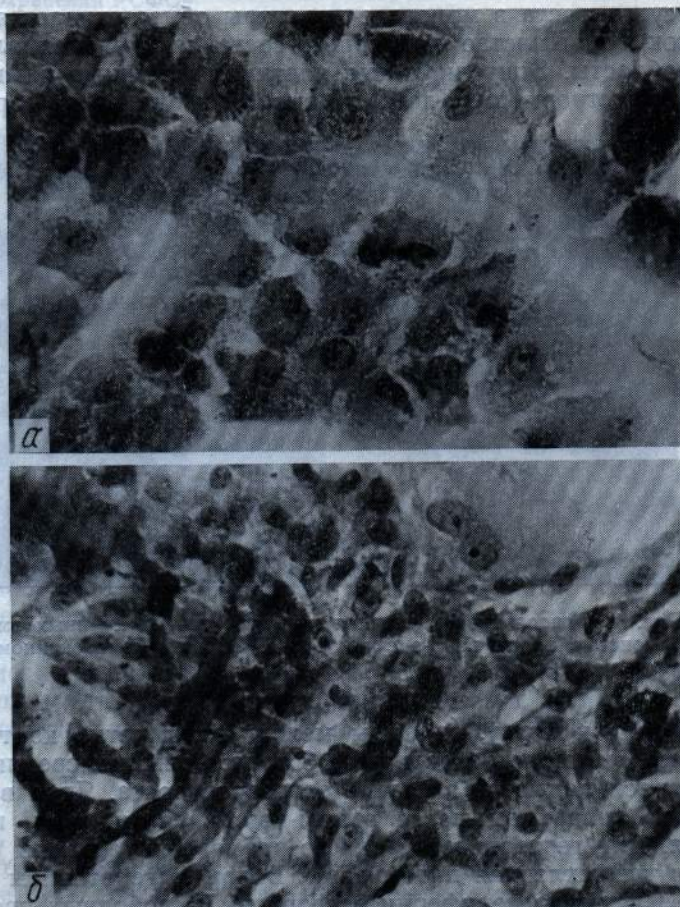


Рис. 2. Действие «безбелкового экстракта селезенки» в разведении 1:1 000 (а) и 1:100 (б) на однослойную культуру печени куриных эмбрионов через 24 ч. Окраска гематоксилином-эозином. $\times 200$.

размеров. Через 48 ч воздействия значительно уменьшается относительное число фибробластов (до 42—48 %). Концентрация экстракта 0,01 мл на 1 мл питательной среды является токсической для гепатоцитов (рис. 2, б). В культуре не обнаружено митозов у обоих видов клеток, резко падает активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. В указанные сроки в 38—42 % гепатоцитов наблюдаются дегенеративные изменения. Уменьшаются масса цитоплазмы (она сильно вакуолизирована), объем ядра в 2 раза (оно гиперхромное), исчезают ядрышки. Усиливается вакуолизация цитоплазмы оставшихся гепатоцитов.

Результаты, полученные при исследовании печени куриных эмбрионов, указывают, что для воспроизведения эффекта стимулирующего влияния спленина и безбелкового экстракта селезенки на гепатоциты важным является подбор оптимальной концентрации указанных препаратов.

Оба исследуемых препарата селезенки в стимулирующих концентрациях вызывают однотипные изменения в гепатоцитах, в частности, вызывают их увеличение за счет ядра и цитоплазмы, появление мелких светлых вакуолей в области аппарата Гольджи, в связи с чем возраста-

ет митотический индекс. Обнаружено, что стимулирующей концентрацией для спленина является концентрация 0,01—0,001 мл на 1 мл питательной среды, для безбелкового экстракта селезенки — 0,001—0,0001. Препараты селезенки резко угнетают размножение и рост фибробластов, они уменьшаются, в них падает активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. При концентрациях спленина и безбелкового экстракта селезенки, выходящих за пределы стимулирующего влияния на гепатоциты, митотический индекс фибробластов повышается, активность исследуемого фермента в них также увеличивается.

Таким образом, биологические препараты селезенки (спленин и безбелковый экстракт) оказывают прямое влияние на гепатоциты однослойной культуры клеток печени эмбрионов кур. Эффект стимулирующего влияния безбелкового препарата селезенки на указанные клетки в несколько раз больше эффекта, стимулирующего влияния спленина.

Однослойная культура клеток печени куриных эмбрионов может применяться как рабочая модель для предварительной оценки активности и подбора оптимальной стимулирующей концентрации вновь выделенных биологических факторов селезенки.

V. V. Korpachov, D. S. Onishchenko

STIMULATING EFFECT OF BIOLOGICAL-ACTIVE SUBSTANCES FROM THE SPLEEN ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF HEPATOCYTES

Studies in the effect of both splenin and spleen «protein-free extract» on the monolayer culture of chick hepatic embryos have revealed that small doses exert a stimulating effect on hepatocytes, while the large ones induce degenerative changes. Hepatotrophic characters of the «protein-free extract» are determined, while utilizing lower doses than those of splenin.

Institute of Endocrinology and Metabolism,
Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Kiev

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анлетова Н. Н. Применение спленина для лечения больных хроническими гепатитами и циррозами печени // Врачеб. дело. — 1963. — № 9. — С. 26—30.
2. Вержовская А. А. Лечение спленином больных острым инфекционным гепатитом // Там же. — 1966. — № 3. — С. 106—110.
3. Геллер Л. И. Физиология и патология селезенки. — М.: Медицина, 1964. — 162 с.
4. Гольбер Л. М. Очерки физиологии и патофизиологии гепатоспленальной системы. — М.: Медицина, 1977. — 204 с.
5. Корпачев В. В. Изучение биологической активности гуморальных факторов селезенки // Актуальные проблемы эндокринологии. — Фрунзе, 1983. — С. 210—212.
6. Фаерман И. Л. Болезни селезенки. — Л., 1928. — 264 с.
7. Шевченко А. В. О механизме детоксикационного действия спленина // Регуляция вегетативных функций. — Киев: Наук. думка, 1965. — С. 245—247.
8. Шевченко А. В., Олейник Б. В. Влияние спленина на очищение крови от бромсульфоталей при экспериментальном токсическом гепатите // Вопр. эндокринологии и обмена веществ. — Киев, 1970. — Вып. 1. — С. 75—77.
9. Komissarenko V. P., Shevchenko A. V. Effect of Spleen Hormonal Factor on the Detoxification Function of the Liver // «Abstracts of short Communications». Fifth Conference of European Endocrinologists. Utrecht the Netherlands 24—29 August 1969, N 85.
10. Söderström N., Lundh B. Patho-anatomical Features of the Spleen and Liver // Clin. in Haematology. — 1975. — 4, N 2. — P. 309—329.

Киев, ин-т эндокринологии и обмена веществ Материал поступил в редакцию 10.06.88
М-ва здравоохранения УССР