

3. Горошинская И. А., Ананян А. А., Броницкая З. Г., Шугалей В. С. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в сыворотке крови при гипероксии, гипоксии и холодном воздействии // *Вопр. мед. химии.*— 1984.— 30, № 1.— С. 60—63.
4. Дударев В. П. Дыхательная функция крови в условиях горных высот и резистентность организма // *Адаптация и резистентность организма в условиях гор.*— Киев : Наук. думка, 1986.— С. 22—30.
5. Идельсон Л. И., Котоян Э. Р. Об оценке качественного метода Бериштейна для определения глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах в условиях экспедиции // *Лаб. дело.*— 1970.— № 7.— С. 428—431.
6. Идельсон Л. И., Рустамов Р. Ш. Влияние рибофлавина и флавинаденинуклеотида на активность редуктазы глутатиона (РГ) эритроцитов у здоровых и у больных людей с дефицитом активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) // *Пробл. гематологии и переливания крови.*— 1973.— 18, № 3.— С. 21—24.
7. Лавровский С. Н. Изоферментные системы малатдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в головном мозге в условиях недостатка кислорода // *Биохимия гипоксии.*— Горький, 1975.— С. 101—105.
8. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика.— М. : Наука, 1981.— 239 с.
9. Рябов С. И., Шостка Г. Д. Эритроцит и почка.— Л. : Наука, 1986.— 219 с.
10. Симановский Л. Н., Парцева М. Н., Лившиц Н. М. Влияние гипоксии на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, гексокиназы и лактатдегидрогеназы в эритроцитах крыс // *Биохимия.*— 1986.— 33, № 5.— С. 942—945.
11. Сиротинин Н. Н. К вопросу о состоянии глутатиона крови на горных высотах // *Тр. Татар. НИИ теорет. и клин. медицины.*— 1934.— Вып. 1.— С. 35—36.
12. Ужанский Я. Г. Физиологические механизмы регенерации крови.— М. : Медгиз, 1968.— 263 с.
13. Хмелевский Ю. В., Заноздра Н. Н., Кахнов Н. Г. и др. Влияние гипоксии на активность витаминзависимых ферментов углеводного обмена в крови и тканях различных органов // *Специальная и клиническая физиология гипоксических состояний.*— Киев : Наук. думка, 1979.— С. 162—163.
14. Шепотинский В. И., Микашинович З. И. Метаболические изменения в клетках крови при различных формах ишемической болезни сердца // *Вопр. мед. химии.*— 1984.— 30, № 1.— С. 25—29.
15. Trojan S., Jelek L., Makoc Z. et al. Vpliv výskove hypoxie na metabolismus glycidu a aminokyselin a na aktivitu některých dehydrogenaz v mozku a na odolnost CNS proti apoxii během ontogeneze krys // *Zb. lek.*— 1971.— 73, N 4.— P. 204—212.

Ин-т физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Материал поступил
в редакцию 05.01.88

УДК 612.357.3:612.015.348

Н. В. Макгон

Электронно-микроскопическое изучение структуры печени крысы при действии антимембранных антител

В организме человека в норме и еще чаще при различных заболеваниях печени выявляются аутоантитела к антигенам плазматических мембран гепатоцитов [4, 5, 7]. Вопрос об их физиологической и (или) патологической роли, а также об особенностях их возможного патогенетического действия на структуру и функции клеток печени не выяснен. Один из способов изучения роли аутоантител в организме — моделирование их действия с помощью антител, полученных в ксеногенной системе.

Ранее нами показано, что антимембранные гетероантитела, полученные иммунизацией кроликов плазматическими мембранами гепатоцитов крыс, введенные в воротную вену печени крыс, уже в ранние сроки (5—30 мин) снижают скорость желчетока. Это снижение обусловлено нарушением транспорта желчных кислот и ионов, связанным со снижением активности Na^+ , K^+ -АТФазы в плазматических мембранах гепатоцитов и, в отличие от действия антител к суммарным антигенам печени, не опосредуется действием гистамина и серотонина [1, 2]. Ультраструктурные изменения клеток печени, лежащие в основе

выявленных функциональных сдвигов, не изучены. Их изучение может расширить представление о механизме нарушения желчеобразования под влиянием антител.

Цель нашей работы — электронно-микроскопическое исследование печени в условиях введения антимембранных гетероантител в воротную вену (с акцентом на изучение состояния плазмалеммы гепатоцитов) и (для сравнения) антител к суммарным антигенам печени.

Методика

В опытах использовали 18 крыс линии Вистар. В качестве антимембранных антител (Ам) применяли гамма-глобулиновую фракцию сыворотки крови кроликов, иммунизированных суспензией везикул плазматических мембран гепатоцитов крыс, полученных по методу Hubbard и соавт. [6]. Антителами к суммарным антигенам (Ас) печени служила гамма-глобулиновая фракция сыворотки крови кроликов, иммунизированных гомотенатом печени крыс. Имунные сыворотки тестировали на сродство к соответствующим антигенам в реакции связывания комплемента. Использовали гамма-глобулин из смеси двух-трех сывороток с титром от 1:200 до 1:400. В качестве контрольного препарата применяли гамма-глобулиновую фракцию неиммунной кроличьей сыворотки (Ан).

Голодавших в течение 18—20 ч крыс наркотизировали нембуталом, вскрывали брюшную полость и вводили соответствующие препараты антител (4 мг/100 г) в воротную вену печени. Кусочки левой боковой доли печени вырезали через 5 и 30 мин после введения антител, фиксировали их в глутаральдегиде, постфиксировали в четырехокиси осмия и заливали в смесь эпон-аралдит. Исследования с применением мембранного трейсера — коллоидного лантана (КЛ) проводили по методу Шарова [3]. Срезы готовили на ультрамикротоме LKB-8800, контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу (за исключением срезов с реакцией на коллоидный лантан) и просматривали в электронном микроскопе JEM-7A. Для обзорной световой микроскопии препараты готовили по общепринятой методике и окрашивали их гематоксилин-эозином.

Результаты и их обсуждение

Ультраструктурные изменения в печени наблюдались уже через 5 мин после введения антител, на 30-й минуте действия антител они были более выраженными.

Оба вида антипеченочных антител (Ам и Ас) изменяли синусоидальную мембрану гепатоцита. Наблюдалось удлинение ворсинок, иногда их слущивание, в некоторых случаях образовывались аркады, вакуоли в ворсинках (рис. 1, а, е). Увеличивалось число микровезикул в васкулярной зоне гепатоцита. Сходное, но значительно менее выраженное действие оказывали и Ан. Ас в большей мере, чем Ам, повреждали синусоидальный полюс гепатоцита: чаще наблюдалось набухание ворсинок, отмечался также их микроклазматоз, что приводило к сглаживанию васкулярной мембраны (рис. 1, з).

Введение Ам приводило к изменениям латеральной области плазмалеммы гепатоцита. Наблюдалось нарушение клеточных контактов типа замка. Часто межмембранные щели были расширенными, иногда в межмембранном пространстве образовывались миелиноподобные структуры (рис. 1, б, в). Следствием этих структурных изменений латеральных мембран было нарушение межклеточных связей, что на уровне световой микроскопии проявлялось в виде дезагрегации гепатоцитов в некоторых трабекулах долек. Ас вызывали подобные структурные изменения лишь в единичных случаях, введение Ан не приводило к нарушению латеральных мембран гепатоцитов.

Желчные капилляры и отграничивающие их соединительные комплексы при действии Ам практически не изменялись, хотя иногда отмечалось некоторое расширение просвета каналикулов (см. рис. 1, в). В то же время Ас часто вызывали довольно значительное увеличение просвета желчных каналикулов, набухание ворсинок, иногда — их слу-

щивание и сглаживание каникулярной мембраны. В желчных капиллярах обнаруживались обрывки мембран и хлопьевидное содержимое. В некоторых случаях мембраны желчных каналикулов полностью трансформировались в миелоноподобные структуры (рис. 1, д).

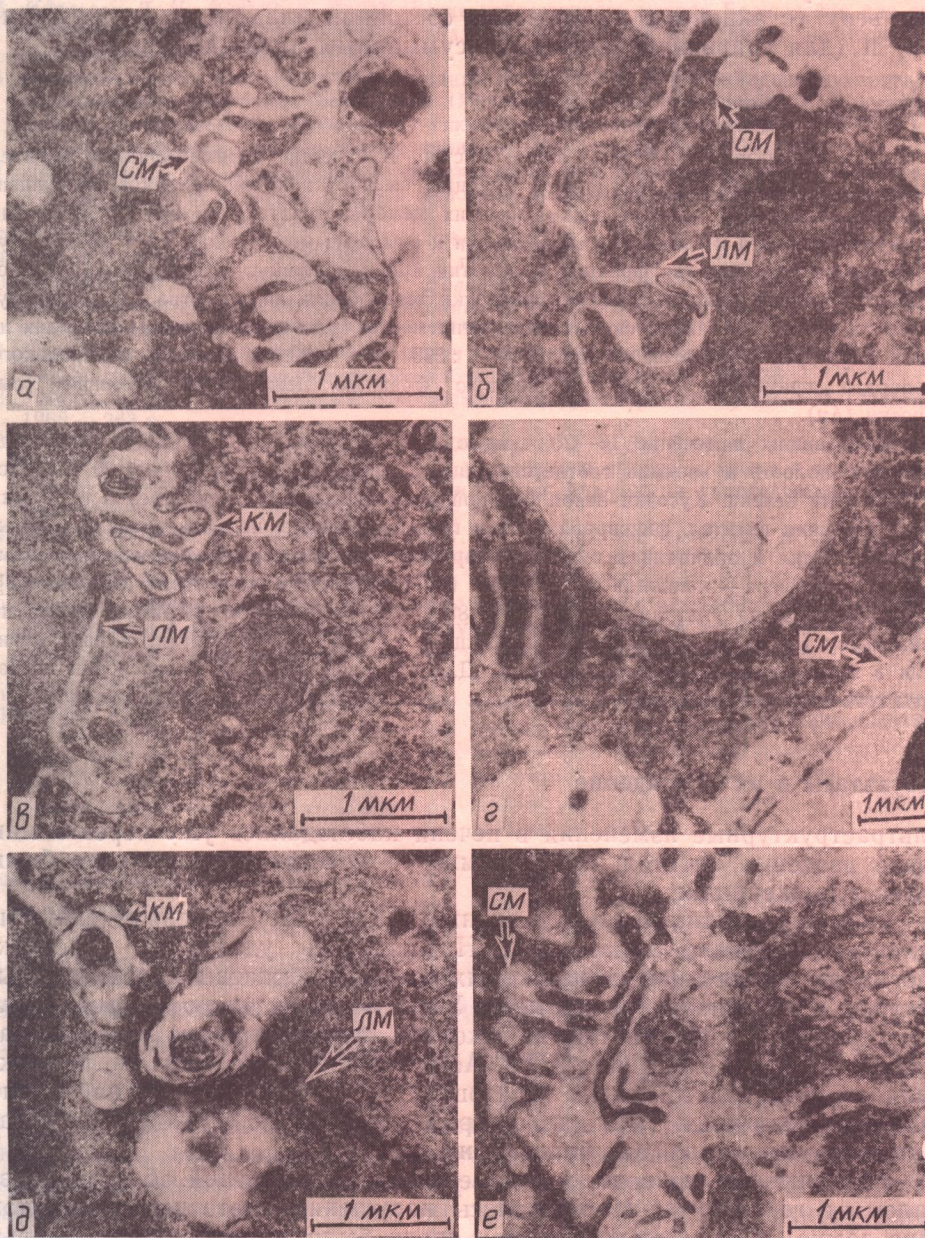


Рис. 1. Электроннограммы печени крыс после введения им в воротную вену антимаембранных антител (а — синусоидальная область; б — латеральная область; в — каналикулярная область гепатоцита) и антител к суммарным антигенам печени (г — то же, что и на а; д — то же, что и на в; е — продукты разрушения эндотелиальной клетки). СМ — синусоидальная мембрана, ЛМ — латеральная мембрана, КМ — каналикулярная мембрана.

Введение всех трех используемых гамма-глобулинов приводило к усилению пино- и фагоцитоза в эндотелиоцитах и звездчатых ретикулоэндотелиоцитах (ЗРЕ), на уровне световой микроскопии — к выраженной базофилии этих клеток, что свидетельствует об активации ретикулоэндотелиальных элементов печени в ответ на введение чужеродного белка в воротную вену. Применение препаратов сопровождалось

также расширением мелких сосудов, синусоидов и вокругсинусоидного пространства, максимально выраженным при введении Ас.

Следует отметить, что Ас обладали значительно большим спектром воздействия на различные структурные элементы печени, чем Ам. Введение Ас приводило к агрегации тромбоцитов и эритроцитов в сосудах и синусоидах, к набуханию эндотелиоцитов и ЗРЭ, образованию в них вакуолей. Наблюдалась также десквамация эндотелиоцитов в просвет синусоидов, в единичных случаях — деструкция этих клеток (см. рис. 1, е). Ам и Ан подобного действия не оказывали. Кроме того, Ас, в отличие от Ам, вызывали изменения цитоплазмы гепатоцитов. При их введении образовывались вакуоли, иногда — значительных размеров, заполненные тонковолокнистым содержимым (см. рис. 1, з). Встречались митохондрии с просветленным матриксом, в единичных случаях — с деструкцией крист.

Существенной характеристикой функционального состояния плазмалеммы является ее проницаемость. Используемый нами метод электронной микроскопии с применением мембранного трейсера КЛ, диаметр частиц которого около 2 нм, позволяет выявлять нарушения целостности мембраны и увеличение ее проницаемости на ранних этапах повреждения клетки. В наших опытах КЛ у интактных животных, а также у животных, которым вводили Ан, локализовался экстрацеллюлярно, маркируя васкулярные ворсинки, межклеточные щели и каналикулы, что свидетельствовало о целостности плазмалеммы (рис. 2, а). Введение антител сопровождалось увеличением проницаемости плазматической мембраны: через 5 мин после воздействия Ам в отдельных случаях можно было наблюдать проникновение электроноплотных частиц в цитоплазму гепатоцитов. В тот же срок после введения Ас частицы КЛ проникали в большее число паренхиматозных и ретикулоэндотелиальных клеток. На 30-й минуте после введения Ас КЛ находился в цитоплазме значительного числа клеток, причем частицы трейсера обнаруживались на кристах митохондрий, что свидетельствовало о повреждении наружной митохондриальной мембраны (рис. 2, б). Повреждение плазмалеммы при действии Ам было выражено в меньшей мере, однако важно отметить, что наблюдалось проникновение КЛ в гепатоциты в зоне латеральных мембран (рис. 2, в).

Проведенные исследования показали, что в действии Ам и Ас имеются сходство и существенные различия. Некоторые эффекты, сопровождающие введение иммунных препаратов (активация эндотелиоцитов и ЗРЭ, расширение мелких сосудов, синусоидов и вокругсинусоидных пространств, удлинение и ветвление ворсинок синусоидального полюса и усиление его везикулизации), проявляются, хотя и в меньшей мере, при введении Ан, что позволяет считать эти изменения реакцией печени на введение чужеродного белка.

Существенным для оценки специфичности действия Ам и понимания их функциональной роли является тот факт, что они практически не вызывают грубых повреждений сосудистой системы и клеток печени, что наблюдается при введении Ас. Многие эффекты (значительное расширение мелких сосудов и синусоидов, вокругсосудистый отек, набухание и микроклазматоз васкулярных ворсинок, образование вакуолей в цитоплазме, агрегация эритроцитов и тромбоцитов), возникающие при введении Ас, могут быть обусловлены действием комплемента и медиаторов патохимической фазы аллергии — гистамина и серотонина. Ас сильнее, чем Ам, нарушают целостность плазмалеммы, что свидетельствует о большем действии комплемента и его мембраноатакующего комплекса. Это можно связать с тем, что в сыворотке крови кроликов, иммунизированных гомогенатом печени крыс, содержатся, помимо антител к антигенам гепатоцитов, также антитела к антигенам сосудистой стенки, белкам и клеткам крови. Введение Ас в воротную вену печени приводит к развитию реакции антиген — антитело и, следова-

тельно, к активации комплемента и выбросу биологически активных веществ, происходящих уже в сосудистом русле. Ам же вступают в связь с антигеном преимущественно на плазмалемме гепатоцита, что и

обуславливает меньшую выраженность реакций, связанных с активацией комплемента, выбросом гистамина и серотонина.

Ам вызывают изменения синусоидальных и латеральных, но не каналикулярных мембран, которых они, по-видимому, не достигают при внутривенном введении. Ас, нарушая в значительной мере целостность клеточной мембраны, проникают в гепатоциты и вступают в реакцию с внутриклеточными антигенами, что усугубляет поражение клетки, приводит к изменению водно-электролитного состава цитоплазмы и образованию вакуолей. В результате этих процессов повреждается цитоскелет гепатоцита, что может привести к расширению просвета каналикула и сглаживанию плазмалеммы каналикулярной области клетки.

Сравнительный анализ действия Ам и Ас свидетельствует о том, что антимаембранные гетероантитела способны вызывать специфические ультраструктурные изменения плазмалеммы

Рис. 2. Электронограммы печени крыс (реакция с коллоидным лантаном):

а — интактная печень, б — после введения антител к суммарным антигенам печени, в — после введения антимаембранных антител. КЛ — коллоидный лантан, Г — гепатоцит, С — синусоид. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

гепатоцитов без повреждения их цитоплазмы и внутриклеточных органелл. Изменения эндотелиоцитов и ЗРЭ при этом минимальны.

Мембранные процессы активного транспорта желчных кислот, ионов натрия и других веществ из крови в гепатоцит и далее — в желчный каналикул играют определяющую роль в желчеобразовании. Ам, изменяя ультраструктуру плазмалеммы гепатоцитов, вызывают и изменения ее транспортной функции, что показано нами ранее для мембранного фермента Na^+ , K^+ -АТФазы [1]. Угнетение активности



этого фермента приводит к снижению секреции желчных кислот и экскреции натрия с желчью [2], т. е. к нарушению желчеобразовательной функции печени в целом. Результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод, что нарушение структуры и функции плазматической мембраны гепатоцита может лежать в основе уменьшения скорости желчетока, а также способствуют раскрытию механизмов действия антимембранных аутоантител и дают основания для использования в эксперименте антимембранных гетероантител в качестве модуляторов структуры плазматических мембран и их функционального состояния.

N. V. Makagon

ELECTRON-MICROSCOPIC STUDIES IN THE ACTION OF ANTIMEMBRANE HETEROANTIBODIES ON THE RAT LIVER

Introduction of heteroantibodies (4 mg/100 g) to plasma membranes of hepatocytes into portal vein of the rat liver caused (already within 5 min) changes in the liver ultrastructure with their intensification by the 30th min. Specificity of the action of antimembrane antibodies (Am) was revealed as against the action of antibodies to summary antigens (As) of the liver. It is shown that Am change, mainly, sinusoidal and lateral regions of the hepatocyte membrane, not disturbing essentially structure of its cytoplasm, intracellular organelles and biliary canaliculi, endotheliocytes and stellate reticuloendotheliocytes, that is observed while introducing As to the liver. Membrane tracer — colloidal lanthanum has revealed that Am increases permeability of hepatocyte plasmollemma to a less degree than As of the liver.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Макогон Н. В., Алексеева И. Н. Влияние антимембранной гепатоцитотоксической сыворотки на желчеотделение и активность Na^+ , K^+ -АТФазы в мембранах гепатоцитов // Физиол. журн.— 1984.— 30, № 2.— С. 196—199.
2. Макогон Н. В. Механизмы нарушения желчеотделения при иммунной патологии плазматических мембран гепатоцитов // Физиол. журн.— 1988.— 34, № 4.— С. 8—12.
3. Уйбо Р. М. Проблема мембранных антигенов в изучении иммунопатологических механизмов поражения печени // Иммунология.— 1988.— № 2.— С. 24—28.
4. Шаров В. Г. Использование коллоидного лантана в качестве электронномикроскопического трейсера // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1981.— 92, № 12.— С. 757—759.
5. Frazer J. H., Jordan T. W., Collins J. R. et al. Antibody to liver membrane antigens in chronic active hepatitis. 4. Exclusion of specific reactivity to polipeptides and glycolipids by immunoblotting // Hepatology.— 1987.— 7, N 1.— P. 4—10.
6. Hubbard A. L., Wall D. A., Ma A. Isolation of rat hepatocyte plasma membranes // J. Cell Biol.— 1983.— 96, N 1.— P. 217—229.
7. Lee W. H., Martin K. L., Shelton L. L., Galbraith R. M. Hepatic membrane antibodies: Studies of prevalens and specificity // Clin. and Exp. Immunol.— 1985.— 62, N 3.— P. 715—723.

Ин-т физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Материал поступил
в редакцию 04.01.90