

15. Ward L. C. Ethanol and protein and amino acid metabolism in heart // Int. J. Biochem.—1987.—19, N 10.—P. 887—897.  
16. Wickramasinghe S. N., Cardner B., Barden G. Circulating cytotoxic protein generated after ethanol consumption: identification and mechanisms of reaction with cells // Lancet.—1987.—N 8551.—P. 122—126.

Харьков. науч.-исслед. ин-т неврологии  
и психиатрии М-ва здравоохранения УССР

Материал поступил  
в редакцию 15.12.89

УДК 612.112.93:612.112.94:616—006—092.4/9

В. В. Овсиенко, И. С. Никольский

## Диссоциация мастолимфоцитарных розеток

Некоторые типы лимфоцитов при контакте с тучными клетками образуют *in vitro* мастолимфоцитарные розетки (МЛР) — ассоциации клеток, состоящие из тучной клетки, присоединившей три и более лимфоцитов [1, 5, 6]. Способность лимфо- и мастоцитов к контактному взаимодействию претерпевает изменения при активации и дифференцировке клеток, их злокачественной трансформации, а также при иммунологических реакциях и опухолевом процессе [2, 4, 7], что предполагает участие исследуемой формы взаимодействия масто- и лимфоцитов в функционировании системы иммунитета. Тем не менее, значение и характер указанных межклеточных контактов остаются неясными и требуют изучения.

В этой статье сообщается о необратимой диссоциации МЛР и факторах, влияющих на этот процесс.

### Методика

Получение тучных клеток и лимфоцитов крыс, а также постановку реакции образования МЛР осуществляли по ранее описанной методике [3]. Клетки тимуса ( $5 \cdot 10^6$ ) и тучные клетки ( $5 \cdot 10^4$ ) смешивали в 1,0 мл среды 199, центрифугировали при 250 *g* в течение 5 мин, осадок ресуспендировали, подсчитывали число МЛР, которые затем инкубировали 1—2 ч при температуре либо 4 °С, либо 37 °С. При постановке реакции использовали только аутологичные клетки. Для каждой крысы определяли исходное число МЛР — относительное число (%) розеток, образованных мастоцитами ( $5 \cdot 10^4$ ) и тимоцитами ( $5 \cdot 10^6$ ) этого животного непосредственно после получения клеток и центрифугирования. Число находящихся в суспензии МЛР в одной и той же пробе через 1 и 2 ч инкубации оценивали по индексу, вычисляемому делением относительного числа (%) розеток, наблюдаемого в каждой пробе через определенный промежуток времени от начала инкубации, на относительное число (%) розеток, наблюдаемое до инкубации МЛР. Способность клеток к образованию МЛР после инкубации в указанных условиях определяли следующим образом. Через 2 ч инкубации клетки ресуспендировали, центрифугировали при 250 *g* в течение 5 мин, надосадочную жидкость отбирали и клетки вновь ресуспендировали в 1,0 мл среды 199, после чего производили подсчет МЛР.

Аналогичные манипуляции проводили с розетками, образованными лимфоцитами периферической крови человека и эритроцитами барана — Е-роzetками, полученными по ранее описанной методике [8].

### Результаты и их обсуждение

Число Е-роzetок, находящихся в суспензии, после инкубации при 4 °С в течение 2 ч практически не изменялось, но после инкубации при 37 °С наблюдалась почти полная диссоциация розеток. При повторном осаж-

© В. В. ОВСИЕНКО, И. С. НИКОЛЬСКИЙ, 1990.



дении клеток центрифугированием и ресуспендировании число Е-розеток восстанавливалось до исходного. МЛР при температуре 4 °С также не диссоциировали, а через час инкубации и после повторного центрифугирования инкубированных в течение 2 ч клеток число МЛР увеличивалось (табл. 1). Так как при такой температуре активные процессы в клетках протекают очень медленно, можно предположить, что повышение способности к образованию МЛР в этих условиях обусловлено

Таблица 1. Результаты статистической обработки значений индекса реакции образования мастолимфоцитарных розеток (МЛР) при различных условиях инкубации

| Статистический показатель | Исходное значение | Инкубация при 4 °С |       |                  | Инкубация при 37 °С |        |                  |
|---------------------------|-------------------|--------------------|-------|------------------|---------------------|--------|------------------|
|                           |                   | 1 ч                | 2 ч   | 2 ч, 250 g 5 мин | 1 ч                 | 2 ч    | 2 ч, 250 g 5 мин |
| M                         | 1,00              | 1,20               | 0,92  | 1,90             | 0,39                | 0,15   | 0,39             |
| ±m                        | 0                 | 0,09               | 0,10  | 0,10             | 0,04                | 0,02   | 0,06             |
| n                         |                   | 11                 | 14    | 10               | 16                  | 27     | 22               |
| P <sub>1</sub>            |                   | —                  | <0,05 | >0,2             | <0,01               | <0,001 | <0,001           |
| P <sub>2</sub>            |                   | —                  | >0,05 | —                | —                   | <0,05  | —                |
| P <sub>3</sub>            |                   | —                  | —     | <0,01            | —                   | —      | <0,05            |
| P <sub>4</sub>            |                   | —                  | —     | —                | <0,01               | —      | —                |
| P <sub>5</sub>            |                   | —                  | —     | —                | —                   | <0,01  | —                |
| P <sub>6</sub>            |                   | —                  | —     | —                | —                   | —      | <0,01            |

Таблица 2. Результаты статистической обработки значений индекса реакции образования мастолимфоцитарных розеток (МЛР) при добавлении к диссоциированным тучным клеткам и клеткам тимуса «свежих» масто- или тимоцитов

| Статистический показатель | Исходное соотношение клеток |               |                                |                                                |               |               |                                                    |               |               |                                                   |
|---------------------------|-----------------------------|---------------|--------------------------------|------------------------------------------------|---------------|---------------|----------------------------------------------------|---------------|---------------|---------------------------------------------------|
|                           | 1:100                       |               |                                |                                                | 1:200         |               |                                                    | 1:50          |               |                                                   |
|                           | Без инкубации               | Инкубация     |                                |                                                | Без инкубации | Инкубация     |                                                    | Без инкубации | Инкубация     |                                                   |
|                           |                             | 1 ч при 37 °С | 1 ч при 37 °С, 5 мин при 250 g | 1 ч при 37 °С, 0,5 ч при 4 °С, 5 мин при 250 g |               | 1 ч при 37 °С | 1 ч при 37 °С, «свежие» мастоциты, 5 мин при 250 g |               | 1 ч при 37 °С | 1 ч при 37 °С, «свежие» тимоциты, 5 мин при 250 g |
| M                         | 1,00                        | 0,35          | 0,35                           | 0,54                                           | 1,42          | 0,56          | 0,90                                               | 0,96          | 0,22          | 0,57                                              |
| ±m                        | 0                           | 0,04          | 0,06                           | 0,11                                           | 0,25          | 0,08          | 0,08                                               | 0,10          | 0,04          | 0,06                                              |
| n                         | 24                          | 24            | 12                             | 12                                             | 9             | 9             | 9                                                  | 9             | 9             | 9                                                 |
| P <sub>1</sub>            | —                           | <0,001        | <0,001                         | <0,001                                         | >0,05         | <0,001        | >0,2                                               | >0,5          | <0,001        | <0,001                                            |
| P <sub>2</sub>            | —                           | —             | >0,05                          | >0,05                                          | —             | <0,01         | <0,05                                              | —             | <0,01         | <0,01                                             |
| P <sub>3</sub>            | —                           | —             | >0,05                          | —                                              | —             | —             | <0,05                                              | —             | —             | <0,01                                             |
| P <sub>4</sub>            | —                           | —             | —                              | >0,05                                          | —             | —             | <0,01                                              | —             | —             | <0,01                                             |

повышением аффинности вследствие физико-химических изменений поверхностных структур. Инкубация МЛР при 37 °С сопровождалась значительным уменьшением их числа, более выраженным через 2 ч. Причем повторное центрифугирование и замена среды не приводили к восстановлению первоначального числа МЛР, как это происходило с Е-розетками. На основании этих данных МЛР можно подразделить на термолabile и термостабильные.

По-видимому, одной из причин диссоциации Е-розеток может быть индукция плазматической мембраны клеток при 37 °С. Однако привлечения одного этого фактора к объяснению диссоциации МЛР мало, так как охлаждение клеток до 4 °С с последующим центрифугированием не приводит к восстановлению числа МЛР (табл. 2).

Таким образом, так же как и Е-розетки, МЛР диссоциируют при 37 °С, однако, в отличие от Е-розеток, диссоциируют практически необратимо. Вероятно, это происходит в результате изменения рецепторных свойств поверхности клеток, входящих в состав МЛР. С целью выяснения вопроса о том, в какой мере сказанное касается масто- или лимфоцитов, был поставлен следующий опыт.



Реакцию образования МЛР проводили с тучными клетками ( $5 \cdot 10^4$ ) и клетками тимуса ( $5 \cdot 10^6$ ) при соотношении клеток 1 : 100. В параллельных пробах, используя вдвое меньшее число тучных клеток или тимоцитов, проводили реакцию образования МЛР (1 : 200 и 1 : 50 соответственно). Индекс реакции определяли отношением числа МЛР в различных пробах к числу розеток в исходных пробах при соотношении клеток 1 : 100. После диссоциации МЛР к суспензии клеток добавляли «свежие» либо тимоциты, либо мастоциты с тем, чтобы соотношение клеток стало 1 : 100. После этого клеточную суспензию центрифугировали и подсчитывали МЛР.

Таблица 3. Результаты статистической обработки значений индекса образования мастолимфоцитарных розеток (МЛР) клетками, обработанными различными образцами надосадочной жидкости (ОНЖ)

| Статистический показатель | Исходное значение | Клетки, обработанные |           |            |        |
|---------------------------|-------------------|----------------------|-----------|------------|--------|
|                           |                   | средой 199           | ОНЖ       |            |        |
|                           |                   |                      | тимоцитов | мастоцитов | МЛР    |
| Тимоциты                  |                   |                      |           |            |        |
| M                         | 1,00              | 1,16                 | 1,31      | 0,95       | 1,27   |
| $\pm m$                   | 0                 | 0,13                 | 0,68      | 0,08       | 0,09   |
| n                         | 10                | 10                   | 10        | 10         | 10     |
| P <sub>1</sub>            | —                 | >0,1                 |           |            |        |
| P <sub>2</sub>            |                   |                      | >0,2      | >0,1       | >0,5   |
| Мастоциты                 |                   |                      |           |            |        |
| M                         | 1,00              | 0,58                 | 0,75      | 0,76       | 0,56   |
| $\pm m$                   | 0                 | 0,07                 | 0,14      | 0,13       | 0,07   |
| n                         | 12                | 11                   | 12        | 11         | 10     |
| P <sub>1</sub>            | —                 | <0,001               |           |            |        |
| P <sub>2</sub>            |                   |                      | >0,2      | >0,2       | >0,5   |
| МЛР                       |                   |                      |           |            |        |
| M                         | 1,00              | 0,24                 | 0,64      | 0,46       | 0,58   |
| $\pm m$                   | 0                 | 0,03                 | 0,10      | 0,11       | 0,07   |
| n                         | 12                | 12                   | 10        | 10         | 10     |
| P <sub>1</sub>            | —                 | <0,001               |           |            |        |
| P <sub>2</sub>            |                   |                      | <0,001    | >0,05      | <0,001 |

Как видно из результатов, представленных в табл. 2, добавление «свежих» тучных клеток приводило к восстановлению числа МЛР до наблюдаемого при реакции клеток в соотношении 1 : 100. Добавление «свежих» тимоцитов не сопровождалось восстановлением числа МЛР, но приводило к заметному его увеличению.

По-видимому, при диссоциации МЛР происходят изменения соответствующих комплементарных структур, обусловленные либо кэпингом с нарушением системы цитоскелета [9], либо шеддингом, либо их маскировкой вследствие процессов, изменяющих поверхность клеток. Причем утрата клетками способности формировать МЛР может быть обусловлена либо изменениями, происходящими с клетками при инкубации независимо от их контакта в МЛР, либо в результате активных процессов, протекающих в клетках после контактного взаимодействия. С целью выяснения этих вопросов был поставлен следующий опыт.

Мастоциты ( $5 \cdot 10^4$ ), клетки тимуса ( $5 \cdot 10^6$ ) или суспензию МЛР, образованных указанным числом клеток, инкубировали в 1 мл среды при 37 °С. После 2-часовой инкубации клетки центрифугировали при 400 g в течение 10 мин и отбирали образцы надосадочной жидкости (ОНЖ), которые использовали в последующих исследованиях.



Клетки тимуса (по  $5 \cdot 10^6$ ) и мастоциты (по  $5 \cdot 10^4$ ) помещали в пробирки, центрифугировали при 400 g в течение 10 мин, среду отбирали, после чего суспензию клеток инкубировали 1 ч при 37 °C в различных ОНЖ или в среде. После инкубации в пробирки с мастоцитами добавляли  $5 \cdot 10^6$  клеток тимуса, а в пробирки с тимоцитами —  $5 \cdot 10^4$  мастоцитов, центрифугировали 5 мин при 250 g подсчитывали МЛР. Также ОНЖ обрабатывали уже сформировавшиеся и ресуспендированные МЛР (табл. 3). Как видно из результатов, представленных в табл. 3, инкубация тимоцитов при 37 °C не оказывает влияния на их способность вступать в МЛР, в то время как инкубация мастоцитов приводит к значительному уменьшению числа образуемых ими розеток. По-видимому, сброс рецепторов с мастоцитов происходит и без их контакта с тимоцитами, однако в МЛР этот процесс протекает активнее, очевидно, в результате кэпинга, и число МЛР через 2 ч инкубации розеток достоверно ниже, чем число МЛР, образованных инкубированными при 37 °C мастоцитами ( $0,24 \pm 0,03$  и  $0,56 \pm 0,07$  соответственно,  $P < 0,001$ ).

Обработка тимоцитов и мастоцитов ОНЖ существенно не изменяет их способности образовывать МЛР (см. табл. 3) и, таким образом, взаимного блока рецепторов не получается, может быть, вследствие малой концентрации рецепторов в ОНЖ. Однако при добавлении ОНЖ к сформировавшимся и ресуспендированным МЛР наблюдается заметное замедление диссоциации розеток, достоверное при использовании ОНЖ тимоцитов и МЛР, что, возможно, происходит из-за наличия в ОНЖ стабилизирующих мембрану веществ.

Таким образом, обнаружено, что при культивировании МЛР при 37 °C происходит их необратимая диссоциация, обусловленная потерей рецепторов плазматической мембраной главным образом тучных клеток и связанная с активными процессами, протекающими в клетках и усиливающимися после их контактного взаимодействия.

V. V. Ovsienko, I. S. Nikolsky

#### DISSOCIATION OF THE MASTOLYMPHOCYTE ROSETTES

It is established that incubation of the mast cells and lymphocytes in vitro in the medium 199 at 4 °C promotes spontaneous formation of mastolymphocyte rosettes. While incubating in medium 199 at 37 °C a considerable part of mastolymphocyte rosettes irreversibly dissociate in contrast to E-rosettes. Loss of ability to the formation of rosettes is due to the loss of the corresponding complementary structures mainly by the mast cells. The data are obtained which allow supposing participation in the process of dissociation of the shedding and capping phenomena induced by contact interaction of masto- and lymphocytes.

Institute of Oncology, Ministry of Public Health  
of the Ukrainian SSR, Kiev

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гюллинг Э. В., Никольский И. С., Дюговская Л. А. Мастолимфоцитарные розетки // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1978.— № 9.— С. 851—853.
2. Гюллинг Э. В., Никольский И. С., Дюговская Л. А. и др. Контактное взаимодействие масто- и лимфоцитов при онтогенетической, антигениндуцированной дифференцировке и злокачественной трансформации лимфоидных клеток // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1980.— № 5.— С. 584—585.
3. Никольский И. С., Гриневич Ю. А., Овсиенко В. В., Черненко О. Д. Факторы влияющие на реакцию образования мастолимфоцитарных розеток // Иммунология.— 1981.— № 5.— С. 90—92.
4. Никольский И. С., Черненко О. Д., Овсиенко В. В. и др. Угнетение интерферонообразования и эндокринной функции тимуса при канцерогенезе, индуцированном метилхолантроном, а также их стимуляция гуморальными факторами тимуса // Эксперим. онкология.— 1983.— № 5.— С. 49—52.
5. Никольский И. С., Маевская Л. П., Овсиенко В. В. Исследование способности клеток из различных лимфоидных образований к формированию мастолимфоцитарных розе-



- ток при экспериментальном канцерогенезе // Тез. докл. VII съезда онкологов УССР.— Киев, 1985.— С. 320—322.
6. Никольский И. С., Мазуренко В. А., Гриневич Ю. А. и др. Мастоцитаффинные лимфоциты как индикаторные клетки некоторых форм гемобластозов // Эксперим. онкология.— 1986.— 8, № 1.— С. 25—26.
  7. Шабалова Н. Н., Самовик С. А. Нейромедиаторы и тучные клетки в регуляции функции тимоцитов // Нейрогуморальная регуляция гомеостаза: Тез. докл. IV Всесоюз. симп. «Регуляция иммунного гомеостаза».— Л., 1986.— С. 124.
  8. Bach J. F. Evaluation of T-cells and Thymic Serum Factors in Man using the rosette technique // Transplant. Rev.— 1973.— 16.— P. 196—217.
  9. Pokorna Z., Viklicki V. A. Study on the conditions of antibody-induced redistribution of membrane antigens in lymphoid cells // Folia biol. (CSSR).— 1978.— 25, N 6.— P. 407—408.

Киев. науч.-исслед. ин-т онкологии  
М-ва здравоохранения УССР

Материал поступил  
в редакцию 28.07.89

УДК 612.017+611.018+612.1+612.3

С. И. Павлович, И. Н. Алексеева

### **Изменение гистоструктуры функциональной активности иммунокомпетентных органов в условиях нарушенного воротного кровоснабжения печени**

Нарушение воротного кровоснабжения печени, встречающееся при ряде заболеваний (флебосклерозе, опухолях, остром панкреатите, острой непроходимости кишечника и других болезнях, сопровождающихся тромбозом воротной вены), а также при наложении порто-кавального анастомоза, приводит к изменению структуры и функций печени [1—5]. Возникающая патология печени и застой лимфы могут привести к изменению общей иммунологической реактивности организма. Данных по этому вопросу в литературе крайне мало. В связи с этим целью нашей работы было изучение гистоструктуры печени и иммунокомпетентных органов (тимуса, селезенки, брыжеечных лимфоузлов), а также содержания плюрипотентных стволовых кроветворных клеток (ПСКК) в костном мозгу и антителообразующих клеток (АОК) в селезенке у мышей в условиях дозированного сужения воротной вены печени.

#### **Методика**

Исследования проведены на 357 мышах-самках линии СВА массой 18—20 г. Сужение воротной вены печени проводили под нембуталовым наркозом перевязкой вены с использованием мандренов различного диаметра и последующим их удалением. В первой серии опытов воротная вена была сужена в среднем на 45 %, во второй серии — на 58 %. В качестве контроля использовали интактных животных, а также ложнопериорванных, которым производили лапаротомию и подведение лигатуры под воротную вену. В различные сроки после операции (от 5 до 27 сут) животных забивали. Печень, тимус, селезенку и брыжеечные лимфоузлы фиксировали 10 %-ным нейтральным формалином. Исследуемый материал обрабатывали общегистологическими методами (окраска гематоксилином и эозином, по Ван Гизон), а также гистохимическими методами с целью выявления РНК, ДНК (по Браше, Фельгену), гликозаминогликанов (по Хейлу и Мак-Манусу), гликогена (по Шабадашу), липидов (по Гольдману). Проводили следующие гистоэнзимологические исследования: определение сукцинатдегидрогеназы (СДГ) по Нахласу, Валькеру и Зелигману, лактатдегидрогеназы (ЛДГ) по Гессу, Скарпелли и Пирсу, кислой фосфатазы (КФ) и щелочной фосфатазы (ЩФ) по Гомори. Определяли также количество ПСКК в костном мозгу методом экзогенного колониеобразования [8] и содержание АОК в селезенке [7]. Результаты обрабатывали статистически с применением критерия *t* Стьюдента.

© С. И. ПАВЛОВИЧ, И. Н. АЛЕКСЕЕВА, 1990.