

9. Петров Р. В., Хаитов Р. М., Манько В. М., Михайлова А. А. Контроль и регуляция иммунного ответа.— Л.: Наука.— 1981.— 311 с.
10. Серебровская Т. В. Способ определения адаптационной способности человека к гипоксии // А. с. 1531986 СССР, А 6135/08 // Открытия. Изобретения.— 1989.— № 48.
11. Серебровская Т. В., Ивашкевич А. А., Майдигов Ю. Л. Исследование связей между реактивностью системы дыхания, умственной и физической работоспособностью и особенностями метаболизма у человека при годичном пребывании в горных условиях // Физиол. журн.— 1989.— 35.— № 4.— С. 61—69.
12. Сиротинин Н. Н. Життя на висотах і хвороба висоти.— Київ: АН УССР, 1939.— 226 с.
13. Сиротинин Н. Н., Антоненко В. Т., Романова А. Ф. и др. Изучение возможности использования условий высокогорья в комплексном лечении больных хроническим лимфолейкозом // Горы и здоровье.— Киев: Наук. думка, 1974.— С. 56—70.
14. Шишмарев Ю. Н., Алексеев Т. И., Никифоров А. М. и др. Клинические аспекты последствий аварии на Чернобыльской АЭС // Радиобиология.— 1992.— 32.— Вып. 3.— С. 26—29.
15. Шубич М. Г. Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего // Цитология.— 1974.— № 10.— С. 1321—1322.
16. Besedovsky H. O., del Rey A., Sorkin E. Immunological-neuroendocrine feedback circuits // Neural modulation of immunity / Ed. by R. Guillemin et al.— New York: Raven press, 1985.— P. 165—172.
17. Borregaard N. The respiratory burst of phagocytosis: biochemistry and subcellular localisation // Immunol. Lett.— 1985.— 11, N 3—4.— P. 165—171.
18. Larrick J. W., Rukmani Pemrathur-Dac, Wright S. C., Milledge J. Hypoxia induced release of interleukin-1 and tumor necrosis factor in vitro and in vivo // The 7th Int. Hypoxia Symp.— Lake Louise: Alberta, 1991.— Abstr. N 59.
19. Löele W. Eine danerfarbung der Oxydasen in myelodischen Leukocyten in Blutansstrich // Dtsch. med. Wochenschr.— 1936.— 62, N 38.— S. 2004—2008.
20. Novikoff A. B., Masek B. Survival of lactic dehydrogenase and DPNH-diaphorase activities after formal-calcium fixation // J. Histochem. and Cytochem.— 1958.— 6, N 4.— P. 217.
21. Petrov R. V., Michailova A. A. Myeloepitides mediators of cooperation between the immune system and the nervous system // Second Int. Work Shop on Nim: Scientific programme and abstracts.— Dubrovnik, 1984.— P. 27.
22. Segal A. W. How do phagocytic cells kill bacteria? // Med. Biol.— 1984.— 62, N 2.— P. 81—84.
23. Serebrovskaya T. V., Ivashkevich A. Effect of a 1-yr stay at altitude on ventilation, metabolism and work capacity // J. Appl. Physiol.— 1992.— 73, N 5.— P. 1749—1755.

Ин-т фізіології ім. О. О. Богомольця
АН України, Київ

Матеріал надійшов
до редакції 19.02.93

УДК 577.1—616.36—092.9:612.017

И. Н. Алексеева, Т. М. Брызгина, С. И. Павлович, В. И. Носарь,
Л. И. Алексюк, Н. В. Макогон, Я. Н. Гоцуляк, Т. В. Мартынова,
О. В. Сидоренко, В. С. Сухина

Кислородзависимые процессы в печени и иммунологическая реактивность организма крыс при хроническом поражении печени четырёххлористым углеродом

У дослідів на щурах лінії Вістар провадили комплексне вивчення активності монооксигеназної системи, перекисного окислення ліпідів, напруги кисню в печінці, а також показників імунологічної реактивності організму при хронічному ураженні печінки чотирьоххлористим вуглецем (CCl_4). Встановлено, що 7-разове введення CCl_4 протягом 19 діб викликає гістоструктурні зміни у печінці, характерні для хронічного ге-

© И. Н. АЛЕКСЕЕВА, Т. М. БРЫЗГИНА, С. И. ПАВЛОВИЧ, В. И. НОСАРЬ,
Л. И. АЛЕКСЮК, Н. В. МАКОГОН, Я. Н. ГОЦУЛЯК, Т. В. МАРТЫНОВА,
О. В. СИДОРЕНКО, В. С. СУХИНА, 1993

патиту. Вміст цитохромів Р-450 і b_5 , деметилазна активність у мікросомальній фракції та напруга кисню в тканині печінки знижуються, а перекисне окислення ліпідів посилюється. Показники імунологічної реактивності — реакція бласттрансформації Т-лімфоцитів крові у відповідь на фітогемаглютинін та вміст циркулюючих імунних комплексів — змінюються протилежним чином: перший показник знижується, другий підвищується.

Введение

Влияние печени на иммунологическую реактивность организма в норме и при патологии осуществляется различными способами. Один из них — микросомальное окисление в печени. При участии цитохрома Р-450 и цитохрома b_5 -зависимой монооксигеназной системы многочисленные экзогенные и эндогенные вещества метаболизируются с образованием реакционноспособных метаболитов, которые образуют конъюгированные антигены [6]. Эти реакции могут привести к активации иммунной системы и усилению антителообразования. Микросомальное окисление в печени связано с перекисным окислением липидов (ПОЛ). Активность цитохрома Р-450 зависит от липидных компонентов, а сами компоненты создаются и компонуется с помощью цитохрома Р-450 [10].

Патогенетическое действие на печень гепатотропного яда — четыреххлористого углерода обусловлено продуктами его метаболизма (CCl_2 и CCl_3), образующимися при участии ферментов монооксигеназной системы цитохрома Р-450. Влияние CCl_4 на иммунную систему в значительной мере опосредуется через поврежденную печень [1]. Имеются доказательства повышения и снижения иммунологической реактивности организма под влиянием CCl_4 [2, 12]. Механизмы патогенетического действия CCl_4 на печень и иммунную систему требуют дальнейшего изучения.

Целью нашей работы было комплексное изучение состояния монооксигеназной системы печени по содержанию цитохромов Р-450 и b_5 , деметилазной активности и ПОЛ в микросомальной фракции, напряжению кислорода (pO_2) в ткани печени, а также показателям иммунологической реактивности, реакции бласттрансформации (РБТ) Т-лимфоцитов крови в ответ на введение фитогемаглютина (ФГА) и содержанию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) у крыс в условиях хронического поражения печени CCl_4 .

Методика

Опыты проведены на крысах линии Вистар массой 200—250 г. Четыреххлористый углерод в виде 50 %-ного масляного раствора семикратно с интервалом в 2 сут из расчета 0,3 мл на 100 г массы вводили животным подкожно. Исследования осуществляли на 7-е и 14-е сутки после окончания применения CCl_4 . Содержание цитохромов Р-450 и b_5 (нмоль/мг белка) и деметилазную активность в микросомальной фракции клеток печени определяли по методике, описанной Карузиной и Аргановым [5]. Напряжение кислорода в печени регистрировали полярографическим методом [3] у животных под нембуталовым наркозом (30—40 мг/кг внутривенно). ПОЛ в гомогенате печени оценивали по общепринятым показателям (усл. ед.), характеризующим кинетику свободнорадикальных процессов при спонтанной и индуцированной серноокислым железом хемилюминесценции [6]. Гистологическое исследование печени проводили по общепринятой методике при фиксации кусочков печени в 10 %-ном нейтральном формалине и окраске срезов гематоксилин-эозином. В препаратах подсчитывали относительное (%) число двуядерных и многоядерных гепатоцитов, митотический индекс (МИ, ‰) и проводили РБТ по методике, описанной Чернушенко и Когосовой [9]. Лимфоциты крови культивировали в течение 4 сут с

ФГА (фирмы «Азур») в бласты. Со- описанной полиэтиленовым зованием

Результаты

Семикратные изменения патита. Та- вотных на- чального с- и баллон- цитов. Во- регенери- рлен в 2- же, чем в- нения в п- хроническ- шение мор- ренхимато- ментов, пр- тов можн- химы печ- клеток с- увеличени- нения с ко-

На 7-е сутки снижение $P < 0,01$. (рис. 1, а) мальной с- введения $\pm 0,04$ нм b_5 — 0,24. На 14-е с- этих пока- ции клето- Однако э- сутки (ко- CCl_4 — 4,9.

Пора- срока ис- ной хими- показател- тосуммы- условиях

Показатели

Относитель- тоцитов, % двуядерн- многояде- Митотическ-

ФГА (фирма «Difco», США; 20 мкг/мл среды). На мазках, окрашенных азуран-эозином, подсчитывали число клеток, трансформированных в бласты. Содержание ЦИК в сыворотке крови определяли по методике, описанной в работе Гриневича и Алферова [4], с применением 3,75 % полиэтиленгликоля. Результаты обрабатывали статистически с использованием критерия t Стьюдента.

Результаты

Семикратное введение CCl_4 в течение 19 сут вызывало морфологические изменения в печени, соответствующие картине хронического гепатита. Так, на 7-е сутки после 7-кратного введения CCl_4 в печени животных наблюдались дисциркуляторные расстройства с признаками начального склероза центральных и собирательных вен, явления зернистой и баллонной дистрофии с цитолизом и некробиозом отдельных гепатоцитов. Вокруг описанных выше зон поражения располагались участки регенерирующей печеночной ткани. При этом МИ гепатоцитов был увеличен в 2 раза, а число двуядерных гепатоцитов было достоверно ниже, чем в контроле (таблица). Таким образом, морфологические изменения в печени крыс в этот срок исследования соответствуют картине хронического гепатита. К 14-м суткам исследования отмечалось улучшение морфологической картины печени. На фоне сохраняющейся паренхиматозной дистрофии печени, реакции соединительно-тканых элементов, пролиферации и гиперплазии звездчатых ретикулоэндотелиоцитов можно было наблюдать выраженные признаки регенерации паренхимы печени, о чем свидетельствовало образование тяжелей молодых клеток с базофилией цитоплазмы и четкими контурами ядер, а также увеличение числа двуядерных и многоядерных гепатоцитов. МИ в сравнении с контролем был повышен.

На 7-е сутки после 7-кратного введения CCl_4 наблюдалось резкое снижение $p\text{O}_2$ в печени: от $19,6 \pm 1,7$ до $10,6$ мм рт. ст. $\pm 1,2$ мм рт. ст., $P < 0,01$. На 14-е сутки этот показатель практически нормализовался (рис. 1, а). Снизилось содержание цитохромов Р-450 и b_5 в микросомальной фракции печени (рис. 1, б). На 7-е сутки после окончания введения CCl_4 содержание цитохрома Р-450 составило $0,27$ нмоль/мг $\pm 0,04$ нмоль/мг (в контроле — $0,37 \pm 0,03$), а содержание цитохрома b_5 — $0,24$ нмоль/мг $\pm 0,02$ нмоль/мг (в контроле — $0,34 \pm 0,03$, $P < 0,05$). На 14-е сутки исследования наблюдалась тенденция к нормализации этих показателей. Деметилазная активность в микросомальной фракции клеток печени также снижалась под влиянием CCl_4 (см. рис. 1, б). Однако это снижение было статистически достоверным лишь на 14-е сутки (контроль — $8,1$ нмоль/мин·мг $\pm 0,4$ нмоль/мин·мг; под влиянием CCl_4 — $4,9$ нмоль/мин·мг $\pm 0,1$ нмоль/мин·мг).

Поражение печени CCl_4 сопровождалось активацией ПОЛ в оба срока исследования (рис. 1, в; рис. 2). Наблюдались усиление спонтанной хемилюминесценции (СХЛ), а также повышение значений ряда показателей индуцированной хемилюминесценции (ИХЛ): общей светосуммы (S), характеризующей накопление перекисных продуктов в условиях максимальной стимуляции ПОЛ, количества гидроперекисей

Показатели регенераторных процессов в печени крыс при введении CCl_4 ($M \pm m$)

Показатель	Интakтные животные (контроль)	Животные после введения CCl_4	
		7-е сутки	14-е сутки
Относительное число гепатоцитов, %			
двуядерных	$9,8 \pm 0,8$	$6,3 \pm 0,7$	$7,9 \pm 0,6$
многоядерных	$0,4 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,2$
Митотический индекс	$1,7 \pm 1,3$	$3,5 \pm 1,8$	$2,4 \pm 1,2$

(h), интенсивности (H) и скорости ($tg \alpha$) ИХЛ. Эти изменения сопровождались угнетением антиоксидантной системы (t_1 и t_2). В первый срок исследования (7-е сутки) указанные изменения были наиболее выражены. Так, СХЛ составила 2135 ± 91 , в контроле, 1399 ± 145 , $P < 0,05$; t_1 и t_2 — $1,23 \pm 0,09$ и $7,8 \pm 0,41$, в контроле — $2,00 \pm 0,2$ и $11,45 \pm 0,65$, $P < 0,05$.

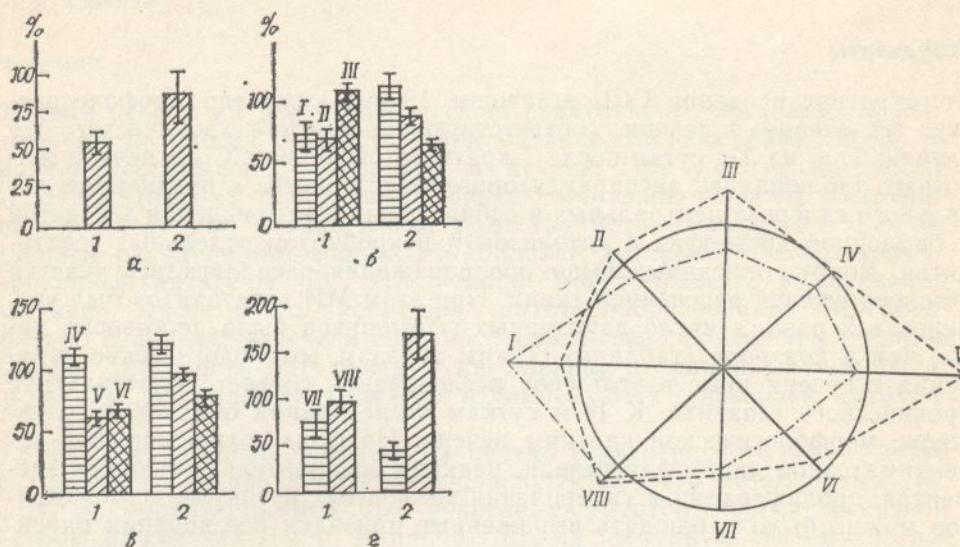


Рис. 1. Относительное изменение (% контроля) показателей состояния монооксигеназной системы печени крыс на 7-е (1) и 14-е (2) сутки после окончания введения животным CCl_4 : а — напряжение кислорода; б — микросомальное окисление (I, II — содержание цитохромов P-450, b_5 соответственно, III — деметилазная активность; в — перекисное окисление липидов (IV — общая светосумма, V — латентный период, VI — время достижения максимума медленной вспышки); г — иммунологическая реактивность (VII — реакция бласттрансформации, VIII — содержание циркулирующих иммунных комплексов).

Рис. 2. Диаграмма относительного изменения (% контроля) показателей индуцированной хемилюминесценции (ИХЛ) гомогената печени на 7-е (штрихпунктирная линия) и на 14-е (пунктирная линия) сутки после окончания введения CCl_4 : I — выраженность спонтанной хемилюминесценции; II — амплитуда быстрой вспышки; III — максимальная амплитуда медленной вспышки; IV — амплитуда остаточного свечения в конце регистрации; V — тангенс угла наклона медленной вспышки, определяющий скорость окисления липидов; VI — латентный период; VII — время достижения максимума медленной вспышки; VIII — общая светосумма. За 100 % (круг) приняты значения показателей ИХЛ гомогената печени интактных животных (контроль).

Два показателя иммунореактивности (рис. 1, г): РБТ лимфоцитов и ЦИК после применения CCl_4 изменялись противоположным образом. Число трансформированных лимфоцитов в РБТ прогрессивно снижалось: на 7-е сутки оно составляло 75 % контроля, а на 14-е сутки — было в 2,2 раза меньше, чем в контроле. Содержание ЦИК в сыворотке крови, не изменившееся в первый срок исследования, к 14-м суткам возросло на 65 %.

Таким образом, поражение печени крыс CCl_4 , развивающееся по типу хронического гепатита (по результатам гистологических исследований), характеризовалось резким нарушением кислородзависимых процессов. Микросомальное окисление ослабевало, что проявлялось в уменьшении содержания ферментов цитохромов P-450 и b_5 , снижении гидроксилазной активности (по результатам определения скорости деметилирования). ПОЛ при этом активизировалось, а активность антиоксидантной системы снижалась. Снижалось и pO_2 в ткани печени. Уменьшение содержания цитохромов в микросомальной фракции клеток печени может быть связано с инактивацией молекул фермента свободными радикалами, образующимися при метаболизме CCl_4 из самой молекулы яда и из липидного окружения в результате активации ПОЛ.

Напряжен-
шие из ко-
мальная с-
и может б-
личества,
ткани печ-
ления, на-
нием его
ми механи-
внутрикле-
личение М-
 CCl_4 сопр-
ставляют
личение о-
ном посту-
дившиеся
зультате
о повыше-
поражени-
В то же
по резуль-
глютинина
шем звен-
ные клетк-
этих клет-
быть разл-
обмена. П-
в лимфоц-
нию функ-
действия
тот факт,
ной фрак-
ви в разл-
обратной
ми предст-
механизм
ма от ксе-

I. N. Alexey
L. I. Aleksy
O. V. Sidore

OXYGEN-D-
AND IMM-
HEPATITIS

The chronic
carbottetrach-
day. It was
liver micros-
while lipid
nesis was in-
higher than

A. A. Bogor
Academy of

СПИСОК Л

1. Алексеев
мунолог
2. Астахов
патита:

ия сопро-
В первый
наиболее
145, $P <$
и 11.45 ±



могеназой
животным
содержание
перекисное
ия дости-
ть (VII —
ых ком-

цирован-
на линия)
женность
иммальная
регистра-
исления
едленной
азателей

моцитов
бразом.
снижа-
тки —
воротке
уткам

еся по
следо-
симых
лось в
жении
ти де-
анти-
чени.
кле-
а сво-
самой
ПОЛ.

И, № 4

Напряжение кислорода в ткани определяется рядом факторов, важнейшие из которых — его доставка и потребление. Известно, что микросомальная система окисления является мощным потребителем кислорода и может быть ответственна за 10—40 % его утилизации от общего количества, связанного с клеточным дыханием [8]. Уменьшение pO_2 в ткани печени на фоне снижения интенсивности микросомального окисления, наблюдаемого в наших опытах, связано, вероятно, не с усилением его потребности в системе микросомального окисления, а с другими механизмами. Такие механизмы могут быть сопряжены с усилением внутриклеточных регенераторных процессов, о чем свидетельствует увеличение МИ гепатоцитов в наших исследованиях. Поражение печени CCl_4 сопровождалось увеличением содержания ЦИК, которые представляют собой преципитаты антител с различными антигенами. Увеличение образования таких преципитатов свидетельствует о повышенном поступлении в кровь антигенов (ими могут быть антигены, освободившиеся из поврежденных клеток, и антигены, образовавшиеся в результате конъюгации реакционных групп ксенобиотиков с белками) и о повышенном образовании антител к этим антигенам. Таким образом, поражение печени CCl_4 способствовало стимуляции иммунного ответа. В то же время снижение функциональной активности Т-лимфоцитов, по результатам реакции бласттрансформации на введение фитогемагглютина, свидетельствует о снижении иммунореактивности в важнейшем звене — в популяции лимфоцитов, к которой относятся регуляторные клетки (хелперы и супрессоры). Механизмы снижения активности этих клеток при поражении печени, в том числе и токсическом, могут быть различными, в частности, связанными с нарушением пуринового обмена. Показано, что у людей при хронических заболеваниях печени в лимфоцитах снижена активность дезаминазы, что приводит к снижению функциональной активности лимфоцитов в результате токсического действия аденозина и дезоксиаденозина [11]. Важным представляется тот факт, что мера снижения содержания цитохромов в микросомальной фракции печени и мера уменьшения активности Т-лимфоцитов крови в разные сроки исследования после применения CCl_4 находятся в обратной зависимости. Эта закономерность согласуется с современными представлениями о том, что монооксигеназная система и иммунные механизмы, выполняя сходные функции по обезвреживанию организма от ксенобиотиков, могут выступать в роли конкурентов [6].

*I. N. Alexeyeva, T. M. Bryzgina, S. I. Pavlovich, V. I. Nosar,
L. I. Alekseyuk, N. V. Makogon, Ya. N. Gotsulyak, T. V. Martinova,
O. V. Sidorenko, V. S. Sukhina*

OXYGEN-DEPENDENT PROCESSES IN THE LIVER AND IMMUNOLOGICAL ACTIVITY OF RATS WITH CHRONIC HEPATITIS CAUSED BY CARBOTETRACHLORIDE

The chronic hepatitis in Wistar rats was induced by seven subcutaneous injections of carbotetrachloride (0.3 ml of 50 % oil solution per 1 kg of body mass) made each third day. It was shown that cytochromes P-450 and b_5 content, demethylase activity in the liver microsomal fraction as well as the oxygen tension in the liver tissue were decreased, while lipid peroxidation was intensified. The PHA-induced blood lymphocyte blastogenesis was inhibited and concentration of circulating immune complexes in the blood was higher than that in intact animals.

A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева И. Н., Брызгина Т. М., Павлович С. И., Ильевич Н. В. Печень и иммунологическая реактивность организма. — Киев: Наук. думка, 1991. — 167 с.
2. Астахов В. С. Особенности течения дизентерии Sonnei на фоне панкреатита и гепатита: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Киев, 1976. — 23 с.