

7. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. — Bydney: Acad. press, 1982. — 156 p.
8. Stoessl A.J. Peptide-dopamine interactions in the central nervous system: implications for neuropsychiatric disorders // J. Psychopharm. — 1989. — 3, № 2. — P. 99—120.
9. Uhi G.R., Shyder S.H. Regional and subcellular distributions of brain neurotensines // Life Sci. — 1976. — 19, № 1. — P. 1827—1832.

Одес. мед. ін-т ім.М.І.Пирогова
М-ва охорони здоров'я України

Матеріал надійшов
до редакції 26.03.93

УДК 612.017:612.36:612.014.47

Н.В.Макогон, І.М.Алексеева

Вплив факторів, що виділяються культивованими гепатоцитами мишей, на проліферацію імунокомпетентних клітин

На первичную монослойную культуру паренхиматозных клеток печени мышей воздействовали в течение 2 ч нормальными кроличьими антителами (0,5 мг/мл), антипеченочными антителами (0,5 мг/мл) и четыреххлористым углеродом (5 ммоль/л). Функциональное состояние клеток оценивали по синтезу ДНК, РНК и белка (по включению меченых предшественников), культуральную жидкость собирали в течение 24 ч после воздействия. Изучали спонтанную пролиферацию *in vitro* (по результатам синтеза ДНК) клеток селезенки, лимфоузлов, тимуса и костного мозга при воздействии на них в течение 66 ч культуральной жидкости интактных и измененных гепатоцитов. Показано, что культивируемые интактные гепатоциты выделяют факторы, изменяющие пролиферацию спленоцитов и тимоцитов. Выявлено разнонаправленное действие культуральной жидкости гепатоцитов на иммунокомпетентные клетки, выделенные из тканей различных органов. Показано также, что по мере углубления функциональных нарушений гепатоцитов (минимальных — при действии нормальных антител, максимальных — при действии четыреххлористого углерода) может изменяться и мера их модулирующего гуморального влияния на клетки иммунной системы.

Вступ

Більшість фактів, що свідчать про гуморальний, переважно супресорний, вплив печінки на імунну систему, одержані при вивченні цього органу як цілого в дослідях *in vivo* та на гомогенаті печінки [6, 7, 10]. Існують дані про зниження проліферації ФГА-стимульованих лімфоцитів інгібіторним протейном гомогенату печінки людини [7], що був ідентифікований як цитоплазматична аргіназа [6]. Однак різні типи клітин, що входять до складу печінки (гепатоцити, клітини Купфера, ендотеліальні клітини) можуть по-різному діяти на імунокомпетентні клітини завдяки специфічності своїх функцій. Так, показано, що клітини Купфера є високоцитотоксичними по відношенню до пухлинних клітин, а гепатоцити і їх безклітинні суперна-

танти зменшують цитотоксичність перших [3]. Відомо також, що при патології печінки її вплив на імунну систему складним чином змінюється від посилення імунореактивності до її зниження [1, 4]. Механізми цього впливу з'ясовані недостатньо.

Метою наших досліджень було виділення і культивування найбільшої популяції клітин печінки (гепатоцитів) мишей, вплив на них за допомогою різних гепатотропних агентів (з оцінкою біосинтетичних процесів) і подальше вивчення дії культуральної рідини гепатоцитів на проліферативну активність спленоцитів, тимоцитів, клітин кісткового мозку та лімфовузлів.

Методика

Гепатоцити мишей виділяли за асептичних умов, використовуючи ферментно-перфузійний метод [3] з деякими змінами. Мишей лінії СВА масою 20–30 г, що голодували 24 год, наркотизували гексеналом. Проводили перфузію печінки через нижню порожнисту вену протягом 5–8 хв прогрітим до 37 °С безкальцієвим розчином (8,3 г/л NaCl, 0,5 г/л KCl, 2,4 г/л Hepes, 0,44 г/л глюкози, pH 7,4). Далі перфузію проводили протягом 10–13 хв 0,05 %-вим розчином колагенази (Worthington), що містив (г/л): 3,9 NaCl, 0,5 KCl, 2,4 Hepes, 0,44 глюкози, 0,5 CaCl₂ і 0,3 MgCl₂, pH 7,4. Печінку промивали і відокремлювали клітини від строми тefлоновим скребком. Гепатоцити відокремлювали від непаренхіматозних клітин за допомогою методу диференційованого центрифугування, осаджуючи їх тричі при 50 g, 30 с. Гепатоцити в концентрації $2 \cdot 10^5$ клітин/см² культивували в водонасиченій атмосфері з 5 % CO₂ при 37 °С в полістиролових камерах з плоским дном, що було двічі вкрите колагеном з хвостів щурів, в 0,5 мл середовища із слідуючим складом: DME (фірма «Sigma», США) і RPMI 1640 (фірма «Sigma», США) 1:1; 10 % ембріональної телячої сироватки; 10⁻⁸ ммоль/л дексаметазону; 10⁻⁸ моль/л інсуліну; 50 од/мл бензилпеніциліну; 50 мкг/мл стрептоміцину; 50 мкг/мл гентаміцину, 2,6 г/л Hepes, 2 г/л NaHCO₃. Через 3–4 год після посадки вилучали клітини, що не прикріпилися. Через 18 год від початку культивування в культуральні камери вносили нове середовище, яке містило: IgG-фракцію нормальної кролячої сироватки (IgG НКС) в дозі 0,5 мг/мл; IgG-фракцію антигепатотоксичної сироватки (IgG АГЦС) в дозі 0,5 мг/мл; 5 ммоль/л чотирихлористого вуглецю (CCl₄), попередньо розчиненого в диметилсульфоксиді. Контрольними були клітини в живильному середовищі без добавок. IgG виділяли за допомогою гель-хроматографії на сефадексі G-200 [9] з нормальної кролячої сироватки (IgG НКС) та з сироватки кролів, що були імунізовані водно-сольовим екстрактом печінки мишей (IgG АГЦС).

Після 2-годинного періоду дії гепатотропних речовин клітини відмивали, частину культур використовували для визначення синтезу ДНК, РНК і білка в перший термін після впливу, а решту культивували в середовищі DME і RPMI 1640 (1:1) без додавання ембріональної телячої сироватки та гормонів. Через 24 год після впливу гепатотропних речовин культуральну рідину збирали, стерилізували фільтрацією через фільтри «Синпор» № 8 та використовували в подальших експериментах з імунокомпетентними клітинами. В культурах гепатоцитів визначали синтез ДНК, РНК та білка в другий термін після впливу. Для визначення синтезу ДНК в культурі вносили ³H-тимідін в кінцевій концентрації 5 мкКи/мл, клітини культивували протягом 5 год. Попередники РНК і білка (³урідін та ³лейцин) додавали в концентрації 10 мкКи на 2 год. Далі моношари відмивали тричі хо-

лодною DME, тричі холодною 5 %-вою ТХУ. Після промивки метанолом і висушування клітини розчиняли в 1 N HCl. Кількість мічених попередників, що включилися в клітини, вимірювали за допомогою ЖС-8 на скінтіляційному лічильнику «Rakcbeta».

Клітини селезінки, тимуса, кісткового мозку та лімфовузлів виділяли з органів декапітованих під легким ефірним наркозом мишей лінії СВА за загальноживаними методами. Клітини селезінки та кісткового мозку відокремлювали від еритроцитів на градієнті густини фіколл-верографіну (1,085) та подальшого їх відмивання. Клітини ($2,5 \cdot 10^6$ /мл) культивували в 200 мкл середовища (DME і RPMI 1640, 5 % ембріональної телячої сироватки, 50 од/мл бензилпеніциліну, 50 мкг/мл стрептоміцину) в водонасиченій атмосфері з 5 % CO_2 . Проліферацію імунокомпетентних клітин (ІКК) досліджували при дії на них рідини від культивованих гепатоцитів (КРГ), інтактних (КРГ_і) та після впливу IgG НКС (КРГ_{НКС}), IgG АГЦС (КРГ_{АГЦС}) та чотирихлористого вуглецю — CCl_4 (КРГ_{CCl4}). Відповідні КРГ вносили в культури ІКК в об'ємі 25 мкл/200 мкл. Через 42 год після посадки ІКК додавали ^3H -тимідін до кінцевої концентрації 5 мкКи/мл і продовжували культивування ще 24 год. Кількість включеного 3 тимідину вимірювали як описано вище.

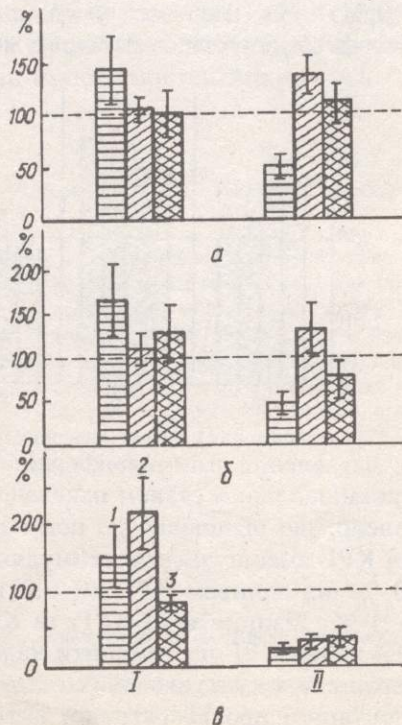
Статистичну обробку результатів провадили за допомогою U-критерія Манна-Уїтні [5].

Результати та їх обговорення

Через 18—48 год після посадки первинна культура клітин печінки складалася з локусів гепатоцитів, переважно розпластаних, які утворювали міжклітинні контакти, що є суттєвим для нормального функціонування клітин (синтезу ДНК, РНК та ін.) [2]. Зустрічалися клітини з зернистою цитоплазмою, нерозпластані клітини, а також окремі гепатоцити на різних стадіях деградації. Гепатоцити складали 84 % від загального числа культивованих клітин.

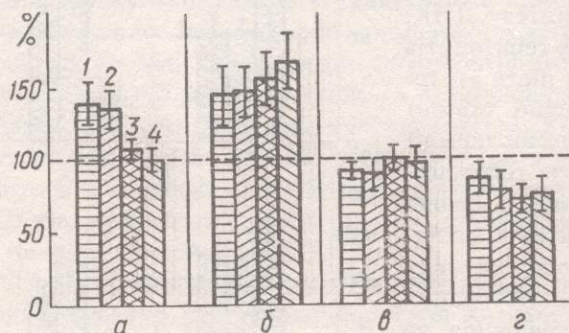
Результати вивчення синтезу ДНК, РНК та білка в моношарах гепатоцитів протягом перших 2—5 год після дії гепатотропних агентів (перший термін) та протягом 24—29 год (другий термін) показані на мал. 1. Інтактні гепатоцити, оскільки культивувалися в наших дослідах без добавки факторів росту, проявляли незначну проліферативну активність. При дії всіх гепатотропних агентів виявлена східна тенденція до підвищення синтезу ДНК в порівнянні з контролем у перший термін ($P < 0,2$) та пригнічення її синтезу у другий

Мал. 1. Зміни синтезу ДНК (1), РНК (2) та білка (3) в гепатоцитах мишей під впливом IgG_{НКС} (а), IgG_{АГЦС} (б) та CCl_4 (в), % від контролю — інтактних клітин: I — перший термін дослідження — через 0—5 год після впливу; II — другий термін дослідження — через 24—29 год після впливу.



термін: на 50 % після дії IgG НКС, на 52 % — IgG АГЦС та на 77 % — CCl₄ ($P < 0,05$ у всіх випадках). Синтез РНК під впливом IgG як імунної, так і неімунної сироваток не змінювався в перший термін дослідження та вірогідно підвищувався у другий термін; CCl₄ змінював цей показник протилежним чином: одразу після дії стимулював синтез РНК (на 114 % від контролю, $P < 0,05$), через 24—26 год значно пригнічував (на 62 % від контролю, $P < 0,01$). Синтез білка в паренхіматозних клітинах, оброблених обома IgG, вірогідно не змінювався по відношенню до контролю в обидва терміни дослідження, проте вірогідно знижувався при дії IgG АГЦС в порівнянні з IgG НКС у другий термін (на 32 %, $P < 0,05$). CCl₄ знижував синтез білка на 61 % від контролю у другий термін після впливу ($P < 0,05$). Таким чином, дія IgG НКС на функціональний стан культивованих гепатоцитів була найменш вираженою і проявлялася в деякому зниженні синтезу ДНК та підвищенні синтезу РНК у віддалений термін. IgG АГЦС впливав на синтез ДНК і РНК подібним чином, однак пригнічував, в порівнянні з IgG НКС, синтез білка. Дія CCl₄ була максимально вираженою та проявлялася в деякій первинній стимуляції гепатоцитів і в подальшому різкому пригніченні синтетичних процесів. Оскільки культуральна рідина збиралася від гепатоцитів, культивованих протягом 24 год після обробки гепатотропними речовинами, можна зробити висновок, що під час виділення гуморальних факторів гепатоцити знаходилися в процесі зміни свого функціонального стану, причому найменші зміни спостерігалися під впливом IgG НКС, а найбільші — від стимуляції до значного пригнічення — під впливом CCl₄.

Результати вивчення проліферації імунокомпетентних клітин під впливом факторів, які виділялися культивованими паренхіматозними клітинами печінки, по відношенню до проліферації ІКК без КРГ, представлені на мал. 2. Показано, що КРГ від інтактних гепатоцитів стимулювала спонтанну проліферацію клітин селезінки (на 40 %, $P < 0,01$) та тимусу (на 45 %, $P < 0,01$). За цих же умов спостерігалася тенденція до пригнічення проліферації клітин кісткового мозку.



Мал. 2. Зміни проліферації імунокомпетентних клітин селезінки (а), тимуса (б), лімфовузлів (в) та кісткового мозку (г) під впливом факторів, що виділяють культивовані гепатоцити (% від значення проліферації в контролі): 1 — дія культуральної рідини інтактних гепатоцитів, 2 — дія культуральної рідини гепатоцитів (КРГ) і IgG_{НКС}, 3 — дія КРГ і IgG_{АГЦС}, 4 — дія КРГ і CCl₄.

Зіставлення змін проліферації ІКК під впливом КРГ від клітин з різним функціональним станом показало наступне. В досліді зі спленоцитами виявлено, що відповідно до поглиблення ураження гепатоцитів стимулююча дія КРГ зменшувалася: стимуляція по відношенню до контролю становила 40 % під впливом КРГ_і ($P < 0,01$); під впливом КРГ_{АГЦС} — 8 %; КРГ_{СС14} — 1 %. Різниця в дії КРГ_і та КРГ_{СС14} була вірогідною, $P < 0,05$. Активуючий вплив КРГ на тимоцити наростав в міру поглиблення функціональних порушень в культивованих гепатоцитах: перевищення відносного значення спонтанної проліферативної активності тимоцитів над значенням у конт-

ролі складало при дії КРГ₁ — 45 % ($P < 0,01$); КРГ_{нкс} — 47 % ($P < 0,05$); КРГ_{агцс} — 56 % ($P < 0,01$); КРГ_{сс14} — 68 % ($P < 0,01$), причому різниця між дією факторів, що містилися в КРГ₁ та КРГ_{сс14} статистично вірогідна ($P < 0,05$). Суттєвих змін проліферації клітин лімфовузлів під впливом різних КРГ не виявлено. В клітинах кісткового мозку, культивованих з КРГ, проліферативна активність знижувалася, Дія КРГ₁ була найменшою, вірогідної різниці не виявлено. Разом з тим гепатоцити зі зміненим функціональним станом виділяли в культуральну рідину фактори, які дещо пригнічували проліферативну активність клітин кісткового мозку: КРГ₁ — на 14 %; КРГ_{нкс} — на 23 % ($P < 0,05$); КРГ_{агцс} — на 29 % ($P < 0,05$); КРГ_{сс14} — на 26 % ($P < 0,05$).

Наведені результати свідчать, що гепатоцити в культурі виділяють речовини, сумарна дія яких на спонтанну проліферацію ІКК може бути як стимулюючою, так і пригнічуючою, в залежності від виду ІКК та функціонального стану клітин печінки. Зіставлення рівня біосинтетичних процесів в гепатоцитах при дії на них гепатотропних речовин з їх стимулюючим гуморальним впливом на проліферацію спленоцитів виявляє паралелізм цих процесів: зменшення біосинтезу ДНК, РНК та білка в гепатоцитах через 24—29 год після дії АГЦС і, особливо, СС14, співвідноситься із зменшенням стимулюючої дії на спленоцити (що може бути результатом або зменшення синтезу стимулюючих факторів, або збільшення в КРГ інгібуючих факторів). Більш уражені гепатоцити знижували також проліферативну активність клітин кісткового мозку. Протилежним чином змінювалася проліферація тимоцитів: найбільш уражені гепатоцити (при дії СС14) призводили до більшої стимуляції тимоцитів. Відмінність ефектів КРГ на ІКК з різних органів, а також протилежну дію КРГ уражених гепатоцитів на спленоцити та тимоцити, можна пояснити тим, що фактори гепатоцитів, інтактних та уражених, специфічні по відношенню до різних популяцій ІКК, міри їх зрілості і т.ін., але це потребує подальшого детального вивчення.

Одержані нами в модельних експериментах (в культурі клітин) результати свідчать про можливість існування в організмі подібного гуморального механізму впливу гепатоцитів на клітини імунокомпетентних органів.

N.V. Makogon, I.N. Alexeyeva

EFFECT OF FACTORS PRODUCED BY CULTURED MICE HEPATOCYTES, ON PROLIFERATION OF IMMUNOCOMPETENT CELLS

Mice hepatocytes in primary cultures were treated during 2 h with normal rabbit antibodies (0,5 mg/ml), antiliver antibodies (0,5 mg/ml) and CCl₄ (5 mM). Functional state of cells was studied according to DNA, RNA and protein synthesis. Cell-free supernatants were collected during 24 h after cells treatment. Spontaneous proliferation in vitro of syngeneic cells from the spleen, thymus, lymph node and bone marrow cultured with hepatocyte supernatants was investigated. Cultured intact hepatocytes were shown to produce factors that changed proliferation of the thymus and spleen cells. Hepatocyte supernatants demonstrated different effect on cells from different immune organs. Hepatocyte function alteration (minimal under normal antibodies treatment and maximal under CCl₄ treatment) changed liver cells humoral influence on the immune cells.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алексеева И.Н., Брызгина Т.М., Павлович С.И., Ильевич Н.В. Печень и иммунологическая реактивность. — К.: Наук. думка, 1991. — 168 с.
2. Гепатоцит: функционально-метаболические свойства / Под ред. Л.Д. Лукьяновой. — М.: Наука, 1985. — 272 с.