

3. Дунина-Барковская А.Я., Миттельман Л.А. Получение первичной культуры гепатоцитов мыши // Цитология. — 1981. — 23, № 8. — С. 944—946.
4. Конопля А.И. Эндогенные иммуномодуляторы как фактор сохранения гомеостаза при патологии печени: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — К., 1989. — 45 с.
5. Рунион Р. Справочник по непараметрической статистике: современный подход. — М.: Финансы и статистика, 1982. — 198 с.
6. Brusdeilins M., Hapke C., Huberts H.H., Schumacher K. Identification of the apparently lymphocyte-specific human liver derived inhibitory protein (LIP) as cytoplasmic liver l-arginase // J. Immunol. — 1983. — 131, № 5. — P. 2427—2431.
7. Chisari F.V. Regulation of human lymphocyte function by a soluble extract from normal human liver // Ibid. — 1978. — 121, № 4. — P. 1279—1286.
8. Cohen S.A., Salazar D., Nolan J.P. Natural cytotoxicity of rat liver cells // Ibid. — 1982. — 129, № 2. — P. 495—501.
9. Flodin P., Killander J. Fractionation of human serum proteins by gel filtration // BBA. — 1962. — 63. — P. 403—407.
10. Kamada N., Sumimoto R., Baguerizo A. et al. Mechanisms of transplantation tolerance induced by liver grafting in rats: involvement of serum factors in clonal deletion // Immunology. — 1988. — 64, № 2. — P. 315—317.

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

Матеріал надійшов
до редакції 29.12.92

УДК 612.017.+612.014.4:612.65

О.В.Баева

Тривалі зміни клітинного імунітету при дії стресу у ранній постнатальний період онтогенезу

Исследовали влияние кратковременных холодовых воздействий с 4-х по 9-е сутки постнатального периода жизни на состояние клеточного иммунитета и гипоталамико-адренокортикальной системы у взрослых животных. Эффект проявлялся в увеличении ФГА-индуцированного синтеза ДНК в спленоцитах и более высоком базальном уровне кортикостерона в сыворотке крови. Кратковременное ежесуточное действие холода с 4-х по 9-е сутки постнатального периода жизни обуславливает снижение реакции клеточного иммунитета и гипоталамико-адренокортикальной системы на 30-минутную холодовую экспозицию у взрослых животных.

Вступ

Стрес чи порушення гормонального балансу можуть справити значний вплив на незрілу нейроендокринну систему, чим визвати тривалу зміну реактивності організму [4], за рахунок прематураційної аутомодифікації функціональної відповіді [5]. Не виключена можливість того, що залучення нервових та гормональних медіаторів стресу у диференціацію гіпоталамуса в ранній період життя може вплинути на формування функцій імунної системи. Доцільність проведення досліджень у цьому напрямку обумовлена слідуючими факторами. По-перше, гіпоталамічні нейромедіатори справляють значну дію на імунний стан організму [6, 8, 10]. По-друге,

здатність відповідати на стресорне подразнення формується у період постнатального онтогенезу паралельно в імунній та ендокринній системах [1].

Метою нашої роботи було вивчення впливу холодового стресу у період раннього постнатального онтогенезу на стан клітинного імунітету у дорослих щурів.

Методика

В експерименті був використаний молодняк, що народився від щурів гетерозиготної популяції «Wistar» розводки розплідника «Раполово» РАН. У дослід брали самців із середніх пометів, аналогів за масою. Щурят з 4-ї по 9-у добу постнатального періоду життя зазнавали впливу холоду, за умов холодильної камери, де автоматично підтримувалася температура в межах 5—0,5 °С, на 30 хв. По досягненні тваринами статевої зрілості (120-а доба постнатального періоду життя) вивчали стан клітинного імунітету. Контролем була група тварин, які не зазнали впливу холоду в ранній період життя. Дорослі тварини обох груп були обстежені за комфортних умов та після 30-хвилинного впливу холоду.

Стан клітинного імунітету оцінювали за показниками спонтанного синтезу ДНК та активації включення ^3H -тимідину при додаванні фітогемоглютиніну (ФГА) та ліпополісахариду (ЛПС) *E.coli* у культуру спленоцитів. Клітини селезінки отримували при розриванні шматочків тканини препаровальними голками. При цьому спленоцити переходили у живильне середовище 199. Клітини фільтрували через нейлон та центрифугували при 4 °С при 2000 g. Осад розбавляли до $1 \cdot 10^6$ кл/мл та на шарували на суміш фіколу з верографіном у співвідношенні 2,5:2,0. Потім центрифугували, збирали інтерфазу та тричі відмивали у середовищі 199. Клітини вводили в культуру, коли їх життєздатність (при фарбуванні трипановим синім) становила більше 95 %.

Культитивування спленоцитів провадили у мікропланшетах у живильному середовищі Ігла з додаванням Нерес, L-глутаміну, гентаміцину та аутосервату. Кінцева концентрація клітин у культурі становила $1\text{—}5 \cdot 10^6$ кл/мл. Загальний час інкубації становив 72 год, за 4 год до закінчення культивування у кожную пробу вносили Н-тимідін (питома радіоактивність становила 2 Ки/ммоль). Клітини осаджували на мембранні фільтри «Synpro», промивали трихлороцтовою кислотою та етанолом. Радіоактивність проб вимірювали на сцинтиляційному лічильнику. Результати представлені у кількості імпульсів за хвилину із розрахунку на $1 \cdot 10^6$ /кл.

Супресорну активність спленоцитів визначали за здатністю Кон-А-індукованих клітин пригнічувати синтез ДНК у змішаній культурі спленоцитів [3]. Міру розвитку реакції організму на холод визначали за зміною концентрації адренокортикотропного гормону (АКТГ) та кортикостерону у сироватці крові. Використовували набори фірми «Sorin» та НДІ експериментальної патології та терапії (м. Сухумі).

Результати дослідів були опрацьовані на ЕОМ, сумісною з IBM PC/AT, за допомогою пакета програм BMDP.

Результати та їх обговорення

В першій серії експериментів показано, що дія холоду протягом 30 хв не призводила до зміни концентрації АКТГ та кортикостерону у сироватці крові 4-добових щурят. На 10-у добу постнатального періоду онтогенезу го-

стра дія холоду викликала підвищення концентрації АКТГ у сироватці крові. У щурів статевозрілого віку дія низьких температур призводила до збільшення у крові концентрації АКТГ і кортикостерону (табл. 1). Таким чином, у постнатальний період онтогенезу є час, коли відсутня реакція гіпофізарно-адrenокортикальної системи на дію холоду, становлення останньої відбувається при подальшому розвитку організму.

Таблиця 1. Дія холоду (-4°C , 30 хв) на реакцію гіпофізарно-адrenокортикальної системи у щурів різного віку ($n=10$)

Вік тварин, група		Концентрація у сироватці крові	
		адrenокортикотропного гормону, пкг/мл	кортикостерону, нмоль/л
Перша серія експерименту			
4-добові	контроль	$37,5 \pm 1,61$	$140 \pm 14,6$
	дослід	$38,2 \pm 1,31$	$141 \pm 10,5$
10-добові	контроль	$51,6 \pm 1,81$	$269 \pm 27,8$
	дослід	$70,6 \pm 2,08^*$	$322 \pm 22,8$
120-добові	контроль	$113,9 \pm 3,42$	$382 \pm 14,6$
	дослід	$135,6 \pm 4,61^*$	$1058 \pm 83,1^*$
Друга серія експерименту			
120-добові	контроль	$116,3 \pm 5,39$	$470 \pm 40,9$
	дослід	$125,5 \pm 2,59$	$1034 \pm 36,4$

* У табл. 1 та 2 для усіх наведених значень $P < 0,05$ порівняно з контролем.

Рівнобіжно із протіканням викладених вище процесів відбувається формування функцій імунної системи. Виявлено, що у 4-добових тварин не змінювалися ні спонтанний синтез ДНК у клітинах селезінки, ні здатність спленоцитів відповідати проліферацією на додавання у живильне середовище ФГА та ЛПС *E.coli*. Активність Кон-А-індукованих клітин-супресорів була трохи підвищеною, що характерно для імунної системи тварин цього віку [11]. Дія холоду статистично вірогідно не впливала на активність клітин-супресорів.

Охолодження 10-добових щурят призводило до підвищення синтезу ДНК у спленоцитах та гальмуванню ФГА- та ЛПС-індукованого включення ^3H -тимідину у клітини. Така ж динаміка вказаних вище процесів спостерігалася і у дорослих щурів (табл. 2).

Таким чином, у щурят формування реакцій імунної та гіпофізарно-адrenокортикальної систем на дію холоду відбувається у ранній постнатальний період онтогенезу.

У другій серії експериментів щурята з 4-ї по 9-у добу постнатального періоду життя щодобово зазнавали впливу холоду. Встановлено, що по досягненні такими тваринами статевозрілого віку у них виявляється тенденція до підвищення базального рівня кортикостерону у сироватці крові. У дорослих щурів, які зазнали короточасних впливів холоду з 4-ї по 9-у добу постнатального періоду життя, 30-хвилинна дія холоду призводила до зниження реакції з боку гіпофізарно-адrenокортикальної системи (див. табл. 1).

Тривалий ефект таких короточасних впливів холоду з 4-ї по 9-у добу постнатального періоду життя, певно обумовлений неспецифічною дією порушення гормонального балансу на недозрілу нейроендокринну систему, що може модифікувати її регуляторні та адаптивні функції. Згідно теорії прематураційної аутомодифікації функціональної відповіді [4], залучення

Таблиця 2. Дія холоду (-4 °C, 30 хв) на клітинний імунітет щурів різного віку

Вік тварин, група		Спонтанний синтез ДНК спленоцитами, імр/хв	Синтез ДНК спленоцитами (індекс стимуляції), індукований		Активність індукованих клітин-супресорів, індекс супресії
			фітогемаглютиніном	ліпополісахаридами	
Перша серія експерименту					
4-добові	контроль	4,4±0,06	1,6±0,15	1,4±0,18	74±4,8
	дослід	4,3±0,04	1,7±0,51	1,5±0,20	76±5,2
10-добові	контроль	1,8±0,04	4,8±0,09	5,0±0,36	71±5,6
	дослід	2,6±0,06*	2,1±0,43*	2,1±0,43*	70±4,1
120-добові	контроль	0,7±0,04	3,9±0,07	4,1±0,17	61±1,7
	дослід	1,9±0,09*	2,6±0,11*	3,6±0,17*	65±2,8
Друга серія експерименту					
120-добові	контроль	0,7±0,04	4,4±0,12	4,3±0,10	59±1,9
	дослід	1,5±0,08*	3,4±0,10*	3,4±0,11*	60±2,0

гормональних зрушень у диференціації гіпоталамусу відбувається за типом гормонально-медіаторного «імпринтингу». Враховуючи роль гіпоталамусу в регуляції функцій імунної системи [2], логічно було б очікувати, що короткочасна дія холоду у ранній період життя впливатиме і на функції імунної системи дорослих тварин, що зазнали у ранній постнатальний період онтогенезу короткочасну дію холоду, виявляється більш високий ФГА-індукований синтез ДНК у клітинах селезінки.

На цей час виявлено, що функції гіпофізарно-адrenокортикальної та імунної систем взаємозв'язані та взаємообумовлені [7, 9, 12]. Тому не дивно, що зниження реакції адrenокортикальної системи на холод встановлено при паралельному зменшенні відповіді клітинного імунітету. Так, у дорослих щурів, які перенесли з 4-ї по 9-у добу постнатального періоду життя дію холоду, 30-хвилинне перебування у холодильній камері призводило до менш виражених змін: збільшення спонтанного синтезу ДНК та гальмування ФГА-обумовленого включення ³H-тимідину у клітини селезінки. Вищезазначені зміни реакцій на дію холоду виявляються при незмінній активності Кон-А-індукованих клітин-супресорів.

Таким чином, у тварин, що зазнали з 4-ї по 9-у добу постнатального періоду життя короткочасної дії холоду, виявляється збільшений ФГА-індукований синтез ДНК у спленоцитах та більш висока концентрація кортикостерону у сироватці крові. Короткочасна щодобова дія холоду, з 4-ї по 9-у добу постнатального періоду життя, обумовлює зниження реакції клітинного імунітету та гіпофізарно-адrenокортикальної системи на 30-хвилинне перебування в холодильній камері дорослих щурів.

H.V.Baeva

LONG-LASTING MODIFICATION OF CELL IMMUNITY UNDER EFFECT OF STRESS IN EARLY POSTNATAL ONTOGENY

Using the model of cold stress in rats in early postnatal ontogeny, it has been established that the raise of PHA induced H-thymidine incorporation into the spleen cells and higher concentrations of corticosterone in the blood serum in adults. It is shown that stressing of animals (+5 ± 0.5 °C, 30 min) on the 4—9th day of postnatal life significantly alters the stress responsiveness in the adult animals.

Pedagogical Institute,
Ministry of Public Education of Ukraine, Cherkassy