

© Г.В. Брюхин, А.А. Федосов, 2005
УДК 611.441:612.65:616.38:599.323.4

Г.В. Брюхин и А.А. Федосов

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ТИМОЦИТОВ И ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПОТОМСТВА САМОК С ХРОНИЧЕСКИМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ПЕЧЕНИ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. Г.В.Брюхин) Челябинской государственной медицинской академии

Цель исследования — сравнительный анализ пролиферативной активности тимоцитов и лимфоцитов периферической крови потомства самок с хроническим экспериментальным поражением печени различного генеза. У взрослых половозрелых самок крыс линии Вистар моделировали токсическое и аутоиммунное поражение печени. Объектом исследования явилось потомство экспериментальных животных в различные сроки постнатального онтогенеза. Пролиферативную активность тимоцитов и лимфоцитов периферической крови потомства животных оценивали путем подсчета доли клеток с множественными ядрышковыми организаторами (AgNOR) и цитофлюориметрического метода с акридиновым оранжевым. Установлено, что у потомства подопытных животных во все сроки исследования имеет место депрессия пролиферативной активности тимоцитов и, напротив, усиление таковой лимфоцитов периферической крови, о чем свидетельствует изменение относительного содержания NOR-активированных клеток и уменьшение содержания нуклеиновых кислот в корковых тимоцитах.

Ключевые слова: тимус, лимфоциты, пролиферация, потомство, патология печени.

В условиях эксперимента показано, что у потомства самок лабораторных животных в период раннего постнатального онтогенеза имеет место депрессия иммунной реакции гиперчувствительности замедленного типа (ПЧЗТ), что свидетельствует об угнетении клеточного иммунитета [2, 4, 6]. Логично предположить, что выявленные нарушения обусловлены изменением количественного и субпопуляционного состава Т-лимфоцитов центрального и периферического компартмента.

Цель настоящего исследования — сравнительный анализ пролиферативной активности тимоцитов и лимфоцитов периферической крови у потомства лабораторных животных с экспериментальным хроническим поражением гепатобилиарной системы различного генеза.

Материал и методы. Объектом исследования явилось потомство самок крыс линии Вистар с экспериментальным хроническим поражением печени токсическим и аутоиммунного генеза в различные сроки раннего постнатального периода (на 1-, 15-, 30-е и 45-е сутки жизни). Для достижения поставленной цели лабораторные животные были разделены на 3 группы. Первую группу — контрольную составили крысята от интактных животных (29 животных из 14 пометов). Во вторую группу — токсическую, вошли животные от матерей с экспериментальным токсическим поражением печени (24 крысенка из 12 пометов). В третью группу были выделены животные от самок крыс с экспериментальным аутоиммунным поражением печени (24 крысенка из 12 пометов).

Для достижения поставленной цели у половозрелых крыс массой 180–200 г моделировали токсическое и аутоиммунное поражение гепатобилиарной системы [1, 5, 13]. Все работы со взрослыми животными и их потомством проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием лабораторных животных». Из эксперимента животных выводили путем декапитации под эфирным

наркозом. Для оценки пролиферативной активности тимоцитов и лимфоцитов периферической крови потомства использовали методику с нитратом серебра [12] и цитофлюориметрический метод с акридиновым оранжевым [8]. Пролиферативную активность тимоцитов оценивали по содержанию NOR-активированных тимоцитов (клеток с множественными ядрышковыми организаторами — AgNOR) [5].

Часть тимуса экспериментальных животных для оценки пролиферативной активности тимоцитов фиксировали в жидкости Карнуа и заливали в парафин, серийные срезы депарафинировали и помещали в свежеприготовленный цитратный буфер (рН 4,2), после чего переносили в раствор акридинового оранжевого 1:30 000 на 5 мин. Для анализа реакции использовали люминесцентный микроскоп Люмам И-3У-42 [8]. Регистрацию специфической люминесценции ДНК ($\lambda=530$ нм, зеленая люминесценция) и РНК ($\lambda=640$ нм, красно-оранжевая люминесценция) проводили с помощью цитофотометрической насадки ФМЭЛ-1А с фотоэлектронным умножителем ФЭУ-79 при напряжении питания 2 кВ. Замеры производили зондом 0,5. Сигнал с ФЭУ регистрировался микровольтметром Щ-4300. Результаты цитофотометрии выражали в условных единицах, соответствующих показаниям микровольтметра.

Лимфоцитарно-моноцитарную клеточную суспензию периферической крови получали по общепринятой методике [11]. С этой целью гепаринизированную кровь разводили изотоническим раствором (1:2) и насаивали на градиент фиколла и верографина, а затем центрифугировали в течение 30 мин при 1500 об/мин. Лимфоцитарно-моноцитарный слой с помощью пастеровской пипетки переносили в силиконизированную пробирку, дважды промывали раствором Хенкса путем центрифугирования. Полученную суспензию ресуспендировали в среде 199. Оценку пролиферативной активности проводили по методу J.Crocker и P.Nar [12].

Результаты исследования. При анализе пролиферативной активности тимоцитов обнаружено, что во все сроки исследования относительное со-

Относительное содержание NOR-активированных тимоцитов и лимфоцитов периферической крови потомства самок-крыс с хроническим поражением печени ($\bar{x} \pm s_p$, %)

Исследованные клетки	Возраст животных (сутки)	Группа животных		
		К	Т	А
Тимоциты	1-е	53,0 $\pm$ 1,3 (n=8)	39,6 $\pm$ 1,9* (n=6)	47,6 $\pm$ 2,6 (n=6)
	15-е	58,7 $\pm$ 1,5 (n=6)	41,2 $\pm$ 2,1* (n=6)	44,0 $\pm$ 1,3* (n=6)
	30-е	58,7 $\pm$ 1,1 (n=8)	44,7 $\pm$ 1,4* (n=6)	42,7 $\pm$ 0,5* (n=6)
	45-е	56,0 $\pm$ 1,5 (n=7)	43,5 $\pm$ 1,7* (n=6)	48,7 $\pm$ 2,6* (n=6)
Лимфоциты периферической крови	1-е	53,6 $\pm$ 1,8 (n=9)	60 $\pm$ 3 (n=8)	33,3 $\pm$ 1,8* (n=7)
	15-е	45,0 $\pm$ 1,7 (n=9)	62,00 $\pm$ 0,09* (n=8)	49,0 $\pm$ 1,7 (n=7)
	30-е	38,0 $\pm$ 1,4 (n=8)	51,3 $\pm$ 1,8* (n=7)	45,5 $\pm$ 0,5* (n=8)
	45-е	33,0 $\pm$ 1,1 (n=8)	50,0 $\pm$ 0,9* (n=8)	46,3 $\pm$ 2,0* (n=8)

Примечание. К — потомство интактных животных (контроль); Т — потомство самок с экспериментальным токсическим поражением печени; А — потомство самок с экспериментальным аутоиммунным поражением печени.

*Различия значимы по сравнению с контролем при $P < 0,05$.

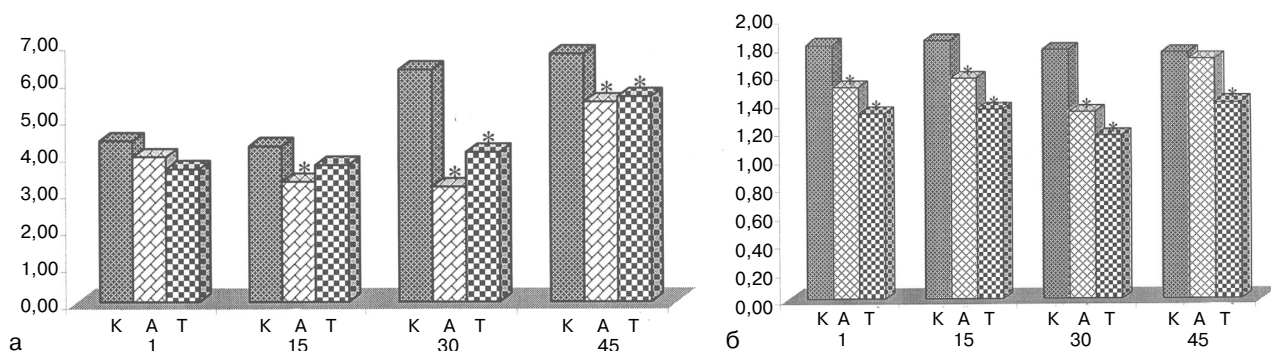
держание NOR-активированных тимоцитов у крысят токсической и аутоиммунной групп снижено по сравнению с таковым у контрольных животных соответствующего срока (таблица), что скорее всего, обусловлено угнетением транскрипционной и пролиферативной активности клеток и, как следствием, является угнетение Т-лимфоцитопоза в центральном компартменте, каким является тимус.

Исследования пролиферативной активности корковых тимоцитов потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени цитофлюориметрическим методом позволили выявить следующую закономерность. У подопытных крысят токсической и аутоиммунной групп во все сроки исследования уровень пролиферативной активности корковых тимоцитов снижен по сравнению с таковым у контрольных животных соответствующего возраста (рисунок). Анализ пролиферативной активности мозговых тимоцитов экспериментальных животных не позволил выявить какой-либо закономерности.

Угнетение пролиферативной активности тимоцитов у экспериментальных животных протекал на фоне усиления таковой лимфоцитов периферической крови. Пролиферативная активность последних у интактных животных после рождения постепенно снижалась и достигала минимальной величины к 45-м суткам жизни (см. таблицу). Такая же закономерность выяв-

лена у животных токсической группы. У животных аутоиммунной группы после рождения к 15-м суткам жизни отмечено резкое увеличение числа NOR-активированных клеток, после чего данный показатель несколько снижался и стабилизировался. Во все сроки исследования пролиферативная активность лимфоцитов периферической крови у крысят токсической и аутоиммунной групп превышала таковую в контроле. Исключение составили новорожденные крысята аутоиммунной группы, у которых относительное содержание NOR-активированных клеток было снижено по сравнению с таковым у 1-дневных интактных крысят (см. таблицу).

Обсуждение полученных данных. В результате многолетних исследований, проводимых в нашей лаборатории по изучению влияния экспериментальных хронических поражений гепатобилиарной системы матери различной этиологии на потомство, установлена следующая закономерность: течение беременности у подопытных животных с хроническим поражением печени, как правило, растягивается на 27–28 сут, в то время как в контроле оно составляет 21–22 сут, при этом снижается фертильность и плодовитость животных, о чем свидетельствует снижение числа животных в помете, увеличивается показатель мертворождаемости. Кроме того,



Содержание ДНК (а) и РНК (б) в корковых тимоцитах потомства контрольных и экспериментальных крыс.

По оси абсцисс: К — крысята от интактных животных (контроль); Т — крысята от самок с экспериментальным токсическим поражением печени; А — крысята от самок с экспериментальным аутоиммунным поражением печени; возраст крысят (сут); по оси ординат — исследованный показатель (усл. ед.); звездочки — различия по сравнению с контролем значимы при $P < 0,05$.

уменьшается масса тела новорожденных крысят и показатель ее ежедневного прироста. При этом снижается жизнеспособность потомства и отмечается задержка на 1–2 сут исчезновения признаков физиологической незрелости: задерживается открывание глазных и ушных щелей, время появления первичного и вторичного шерстного покрова и др. [3]. Вместе с тем, в специальной серии исследований была установлена депрессия клеточного иммунитета, о чем свидетельствует угнетение наиболее чувствительного индикатора клеточного иммунного ответа — реакции ГЗТ [2]. В свете результатов настоящего исследования механизм нарушения развития потомства от матерей с хроническим экспериментальным поражением печени можно представить следующим образом. Патология гепатобилиарной системы самки обуславливает повышение проницаемости гематоплацентарного барьера [9], что ведет к поступлению из крови матери в кровь плода различных продуктов метаболизма: специфических (печеночных) антител, циркулирующих иммунных комплексов, сенсibilизированных цитотоксических Т-лимфоцитов. Массированное поступление из организма матери в кровь плода перечисленных выше соединений приводит к нарушению условий внутриутробного развития, что неблагоприятно отражается на структурно-функциональном состоянии различных органов и функциональных систем плода. Одним из результатов изменения условий гистогенеза и органогенеза является нарушение морфофункционального становления тимуса как центрального органа иммунитета. Это находит свое отражение в изменении специфического внутритимусного микроокружения, изменении субпопуляционного состава тимоцитов и Т-лимфоцитов периферической крови, подавлении Fas-зависимого апоптоза лимфоцитов тимуса и периферической крови [10]. В свою очередь, перечисленные факторы могут являться причинами снижения транскрипционной и пролиферативной активности тимоцитов. Выявленное нами у подопытных животных усиление пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови по сравнению с таковой в контроле, по-видимому, может быть проявлением повышенной активации антигензависимой стадии лимфоцитопоеза, так как пролиферация клона заложена в жизненную программу каждого лимфоцита (в периферических органах после встречи с антигеном) [7].

ЛИТЕРАТУРА

- Абдулаев Н.Х. и Каримов Х.Я. Печень при интоксикации гепатотропными ядами. Ташкент, Медицина, 1989.
- Брюхин Г.В. Интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа у потомства самок крыс с хроническим поражением печени. Физиол. журн., 1990, № 6, с. 97–99.
- Брюхин Г.В. Влияние хронических холестатических поражений печени матери на потомство в условиях эксперимента. Морфология, 1994, т. 106, вып. 2, с. 18–21.
- Брюхин Г.В., Барышева С.В. и Николина О.В. Характеристика готовности к пролиферации и апоптозу тимоцитов и лимфоцитов периферической крови при экспериментальном хроническом поражении печени. Морфология, 2004, т. 126, вып. 6, с. 43–45.
- Брюхин Г.В., Михайлова Г.И. и Пашнина Е.Н. Сравнительная характеристика структурно-функциональных изменений селезенки потомства самок крыс с экспериментальным хроническим поражением печени различной этиологии. Морфология, 2005, т. 127, вып. 3, с. 48–51.
- Брюхин Г.В. и Пашнина Е.Н. Готовность к пролиферации лимфоцитов селезенки потомства крыс при хронической патологии печени матери. Морфология, 2005, т. 127, вып. 2, с. 59–61.
- Епифанова О.И., Тверских В.В. и Полуновский В.А. Регуляторные механизмы пролиферации клеток. М., Медицина, 1988.
- Козинец Г.И., Котельников В.М. и Гольдберг В.Е. Цитотометрия гемопозитических клеток. Томск, изд. Томск. ун-та, 1986.
- Савченков Ю.И. и Лобынцев К.С. Очерки физиологии и морфологии функциональной системы мать—плод. М., Медицина, 1980.
- Федосов А.А. Структурно-функциональная характеристика тимуса у потомства матерей с хроническим поражением гепатобилиарной системы различного генеза в условиях эксперимента: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Оренбург, 2003.
- Фримель Г. Иммунологические методы. М., Медицина, 1987.
- Crocker J. and Nar P. Nucleolar organising regions in lymphomas. J. Pathol., 1987, v. 151, p. 111–118.
- Lohse A.W., Manns M. and Dienes H.P. Experimental autoimmune hepatitis: disease induction time course and T-cell. Hepatology, 1990, v. 11, № 1, p. 24–30.

Поступила в редакцию 02.10.2003 г.
Получена после доработки 19.05.2005 г.

THE CHARACTERISTIC OF PROLIFERATIVE ACTIVITY OF THYMOCYTES AND PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN THE OFFSPRING OF FEMALES WITH EXPERIMENTAL CHRONIC LIVER DISEASES OF VARIOUS AETIOLOGY

G.V. Briukhin and A.A. Fedosov

The aim of the study was a comparative analysis of the proliferative activity of thymocytes and peripheral blood lymphocytes in the offspring of female rats with chronic liver pathology of various genesis. In adult female Wistar rats toxic and autoimmune forms of liver lesions were modeled. The offspring of these experimental animals was studied at different time points of postnatal ontogenesis. Proliferative activity of thymocytes and lymphocytes was estimated by counting the proportion of cells with multiple nucleolar organizing regions (AgNORs) and using the cytofluorometric method with acridine orange. In the offspring of experimental animals, the depression of proliferative activity of thymocytes as well as the increase of the proliferative activity of peripheral blood lymphocytes were found at all the time points studied. This was indicated by a change in a relative number of AgNORs-activated cells and a decrease of nucleic acid content in cortical thymocytes.

Key words: *thymus, lymphocytes, proliferation, offspring, liver pathology.*

Department of Histology, Cytology and Embryology, Chelyabinsk State Medical Academy.