

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. ВОГОМОЛЬЦЯ

На правах рукопису

ПОРТНИЧЕНКО Алла Георгіївна

ОСОБЛИВОСТІ ГУМОРАЛЬНОЇ МОДУЛЯЦІЇ ФУНКЦІЯ НЕЙТРОФІЛІВ
ПАРЕНХІМАТОЗНИМИ І НЕПАРЕНХІМАТОЗНИМИ КЛІТИНАМИ ПЕЧІНКИ
В НОРМІ ТА ПРИ ПАТОЛОГІЇ

14.03.05 – патологічна фізіологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

КИЇВ - 1996



00760058 (Q)

Ab. 35. 741

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті фізіології ім. О.О.Богомольця
Національної Академії наук України

Науковий керівник: доктор біологічних наук
Алексєєва Ірина Миколаївна

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
Середенко Михайло Михайлович;
кандидат медичних наук
Опанаск Надія Дмитрівна

Провідна установа: Український державний медичний
університет ім. акад. О.О.Богомольця

Захист відбудеться " 5 " листопада 1996 р. о 14 годині
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д-01.13.01
при Інституті фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України
за адресою: 252024, м.Київ, вул.Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту
фізіології ім.О.О.Богомольця.

Автореферет розісланий "___"_____ 1996 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
доктор біологічних наук

3.О.Сорокіна-Маріна

АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ. Класичні уявлення про нейтрофіл як клітину, що забезпечує реакції неспецифічної резистентності організму і розвиток запалення, останнім часом значно розширені. Завдяки поглибленому вивченню функцій нейтрофілів на клітинному та молекулярному рівні виявлено багато невідомих раніше механізмів функціонування цих клітин (L. Koenderman et al., 1989; K. Parker et al., 1989; F. Rossi et al., 1989; T. Howard et al., 1990; M. Perry et al., 1991; B. Cronstein et al., 1992; A. Lefter, X. Ma, 1994 та ін.).

Нейтрофіли першими реагують на інфекцію або пошкодження тканин, виконуючи складний комплекс фагоцитарних і нефагоцитарних реакцій, спрямованих на знешкодження та елімінацію патологічного агента (В. Пигаревский, 1978; А. Маянский, Д. Маянский, 1989). Гуморальні продукти нейтрофілів можуть спричинювати вторинну альтерацію тканин і опосередковувати взаємодію нейтрофілів між собою та з іншими клітинами, що у багатьох випадках визначає розвиток патологічного процесу (S. Weiss, 1989; J. Pohl et al., 1990; K. Yoshimura et al., 1994). Показано, що реакції міжклітинної кооперації з участю нейтрофілів можуть визначати розвиток деструктивних, регенераційних, продуктивних, імунних і аутоімунних, алергічних та інших патофізіологічних процесів. Встановлено значну роль нейтрофілів у патогенезі ряду захворювань (G. Ricavuti, A. Mazzone, 1989; F. Brennan et al., 1990; T. Radwan et al., 1990; K. Yoshimura et al., 1993; B. Ramos et al., 1994). Однак при різних захворюваннях та пошкодженнях печінки роль нейтрофілопосередкованих реакцій у розвитку патологічного процесу залишається недостатньо з'ясованою.

Дослідження *in vitro* функцій клітин печінки в останні

роки виявило, що функціонування цього органа являє собою комплекс складних стромально-паренхіматозних реакцій, які детермінують гомеостаз у печінці і всьому організмі (Д.Маянський, 1992). Характер нейтрофілопосередкованих процесів у печінці в нормі і при патології може визначатися диференційованим впливом різних популяцій клітин печінки, а також взаємодією останніх з можливою модифікацією їх функцій. Хоча деякі аспекти впливу на нейтрофіли таких клітин, як макрофаги та ендотеліоцити, відомі (R.Basford et al., 1990; J.Djeu et al., 1990; C.Hebert et al., 1990; R.Ribeiro et al., 1990; U.Von Andrian et al., 1991; В.Земсков и соавт., 1993), особливості їх функціонування як непаренхіматозних клітин печінки потребують конкретного вивчення. Впливу на нейтрофіли найбільшій клітинній популяції печінки - гепатоцитів - присвячено лише поодинокі роботи (A.Thornton et al., 1990, 1991; J.Spitzer, P.Zhang, 1995).

За патологічних умов продукція клітинами печінки різних гуморальних факторів, здатних стимулювати або пригнічувати функції нейтрофілів, може істотно змінюватися (E.Gonda et al., 1986; Г.Божко и соавт., 1990; И.Алексеева и соавт., 1991; N.Dobrotina et al., 1991; J.Spitzer, P.Zhang, 1995). Внаслідок цього нейтрофілопосередковані реакції в умовах різних патологічних процесів у печінці, наприклад, токсичного, інфекційного або аутоімунного процесів, можуть мати суттєві відмінності, які досі не були охарактеризовані.

З огляду на значну поширеність захворювань і токсичних уражень печінки, які супроводжуються високою летальністю й інвалідизацією хворих (С.Польмова, 1984 та ін.), не викликає сумніву необхідність конкретизації патогенетичних аспектів

розвитку цих захворювань. У зв'язку з цим уявляється актуальним уточнення фізіологічних особливостей впливу різних популяцій клітин печінки на нейтрофіли та модуляції цього впливу при різних пошкодженнях печінки.

МЕТА РОБОТИ: вивчити особливості модуляції функціональної активності нейтрофілів у мишей паренхіматозними і непаренхіматозними клітинами печінки, інтактними та при впливі різних гепатотропних агентів.

ЗАДАЧІ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. Вивчити вплив гуморальних продуктів, які виділяють інтактні паренхіматозні та непаренхіматозні клітини печінки при культивуванні, на різні функції нейтрофілів (хемотаксис, активацію кисеньзалежного метаболізму, дегрануляцію, фагоцитоз).
2. Встановити характер зміни вказаних функціональних реакцій нейтрофілів під впливом факторів, що продукують паренхіматозні і непаренхіматозні клітини печінки за умов дії на них нормальних гетерогенних антитіл (IgG-фракції нормальної кролячої сироватки).
3. Вивчити модуляцію функцій нейтрофілів паренхіматозними і непаренхіматозними клітинами печінки, обробленими проти-печінковими антитілами (IgG-фракцією антигепатоцитотоксичної сироватки).
4. Виявити зміни різних функцій нейтрофілів під впливом паренхіматозних і непаренхіматозних клітин печінки, уражених тетраклорметаном (CCl₄).
5. На підставі виявлених закономірностей модуляції різних функцій нейтрофілів гуморальними чинниками паренхіматозних і непаренхіматозних клітин печінки проаналізувати можливу

участь нейтрофілів у розвитку патологічного процесу у цьому органі.

НАУКОВА НОВИЗНА. Вперше показано, що культивовані інтактні паренхіматозні клітини печінки виділяють термолабільні і термостабільні гуморальні фактори, що модулюють різні функціональні реакції нейтрофілів. Суттєво доповнено фактичний матеріал про продукцію таких чинників непаренхіматозними клітинами печінки. Вперше визначені характерні особливості активації нейтрофілів паренхіматозними і непаренхіматозними клітинами печінки. Встановлено, що при наявності патологічного впливу на обидві популяції клітини печінки зростає продукція ними факторів, які активують нефагоцитарні реакції нейтрофілів, що може посилити деструкцію тканин.

Вперше показано особливості змін продукції гуморальних чинників клітинами печінки при впливі на них нормальних гетерогенних антитіл, протипечінкових антитіл і тетрахлорметану. Вперше виявлено дію термолабільного фактора, який пригнічує активацію кисеньзалежних реакцій і фагоцитозу нейтрофілів, і встановлено, що він продукується непаренхіматозними клітинами печінки при впливі протипечінкових антитіл.

Співставлення й узагальнення одержаних даних дозволило вперше охарактеризувати переважний напрямок розвитку функціональної відповіді нейтрофілів на гуморальні чинники клітин печінки в нормі та при імунному і токсичному впливах на них, а також роль гуморальної регуляції функцій нейтрофілів клітинами печінки в розвитку патологічного процесу в цьому органі.

ТЕОРЕТИЧНЕ І ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ РОБОТИ. Результати вивчення впливу гуморальних чинників клітин печінки на ней-

трофіли дозволяють доповнити фізіологічні відомості про деякі функції печінки і системи неспецифічного захисту організму, а також їх гуморальну взаємодію. Дані про особливості модуляції функціональних реакцій нейтрофілів клітинами печінки при імунному та токсичному впливі на них можуть стати внеском до теорії патогенезу захворювань печінки, уточнити участь цього органа в розвитку патологічних процесів у організмі. Аналіз показників функціональних реакцій нейтрофілів може стати основою для уточнення механізмів активації нейтрофілів клітинами печінки, цілеспрямованого вивчення гуморальних чинників, що беруть участь у цих процесах.

Результати досліджень дозволяють дати рекомендації про необхідність поглибленого вивчення системи неспецифічної резистентності при захворюваннях печінки, доповнення існуючих схем обстеження хворих на цю патологію, що дозволить розробити варіанти патогенетичного лікування в залежності від функції нейтрофільної ланки гомеостазу.

ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ, ЩО ВІНОСЯТЬСЯ НА ЗАХИСТ

1. Паренхіматозні та непаренхіматозні клітини печінки, інтактні та за умов обробки гепатотропними агентами, здійснюють модулюючий вплив на функції нейтрофілів. Цей вплив опосередковується через продуковані клітинами печінки термолабільні й термостабільні гуморальні фактори.
2. Гуморальний вплив на нейтрофіли паренхіматозних і непаренхіматозних клітин печінки є істотно різним за переважною активацією тих чи інших функціональних реакцій нейтрофілів та мірою активації цих реакцій.
3. При впливі нормальних гетерогенних антитіл і тетрахлорметану паренхіматозні та непаренхіматозні клітини печінки про-

дукують чинники, що стимулюють функціональні реакції нейтрофілів.

4. При дії протипечінкових антитіл паренхіматозні і непаренхіматозні клітини печінки продукують фактори, які пригнічують активацію нейтрофілів.

5. Гуморальна модуляція функцій нейтрофілів паренхіматозними і непаренхіматозними клітинами печінки за умов впливу патологічних агентів може бути важливою ланкою патогенетичних механізмів розвитку захворювань печінки.

АПРОБАЦІЯ РОБОТИ. Основні матеріали дисертації демонструвались, доповідались та обговорювались на Конференції наук.-мед. товариства патофізіологів України (Дніпропетровськ, 1992), 3-му Міжнародному симпозиумі "Системно-анти-системна регуляція у живій і неживій природі" (Київ, 1993), Пленумі наук.-мед. товариства патофізіологів України (Львів, 1993), 14-му з'їзді Укр. фізіол. товариства ім. І.П.Павлова (Київ, 1994), об'єднаному засіданні Українського та Київського міського товариств патофізіологів (Київ, 1994).

ПУБЛІКАЦІЇ. За матеріалами дисертації опубліковано 7 наукових праць.

ДЕКЛАРАЦІЯ ОСОБИСТОГО ВНЕСКУ. Автором самостійно проведено експериментальне дослідження, обробку, аналіз і викладення результатів. Фрагмент експериментальної роботи з культивування клітин печінки проведено спільно з співробітниками відділу імунології та шитосироваток Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України.

ОБСЯГ І СТРУКТУРА РОБОТИ. Дисертація викладена на 144 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 6 таблицями і 10 малюнками, складається із вступу, п'яти розділів, висновків

і списку цитованої літератури, який вміщує 31 вітчизняних і 211 зарубіжних джерел.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено на первинних культурах паренхіматозних і непаренхіматозних клітин печінки та ізолюваних нейтрофілах периферичної крові 146 мишей лінії СВА різної статі віком 3-4 місяці, масою 20-25 г. Для одержання антигепатотоксичної сироватки і нормальної кролячої сироватки використано 8 безпородних кролів різної статі масою 2-2,5 кг.

Клітини печінки виділяли ферментно-перфузійним методом (А. Дунина-Барковская, Л. Миттельман, 1981) та культивували у вологонасиченій атмосфері з 5% CO₂ при 37 °С у плоских полістиролових камерах моношаром густиною $2 \cdot 10^5$ клітин/см² у 0,5 мл середовища DME+RPMI 1640 (1:1) з 10% інактивованої ембріональної телячої сироватки, по 10^{-8} моль/л дексаметазону і інсуліну, 50 Од/мл бензилпеніциліну, по 50 мкг/мл стрептоміцину і гентаміцину, 2,6 г/л Hepes, 2 г/л NaHCO₃.

Через 18 годин клітини на протязі 2 год обробляли 0,5 мг/мл IgG-фракції нормальної кролячої сироватки (IgG НКС) або антигепатотоксичної сироватки (IgG АГЦС), або 5 ммоль тетраклорметану (CCl₄), розведених у 0,5 мл середовища культивування. IgG-фракції одержували методом гелі-фільтрації на сефадексі G-200 (P. Flodin, J. Killander, 1962; Л. Остерман, 1985) нормальної кролячої сироватки та антигепатотоксичної сироватки, вилученої після 5-кратної імунізації кролів водно-сольовим екстрактом печінки мишей СВА (И. Алексеева и соавт., 1991). Контрольні популяції клітин печінки (інтактні) не піддавали впливу гепатотропних

агентів. Після обробки клітин середовище змінювали.

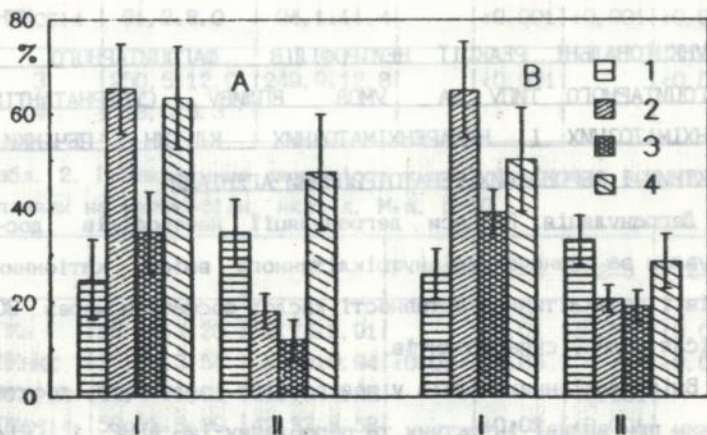
Культуральні супернатанти збирали через 24 год після закінчення впливу на клітини печінки. Для визначення можливої природи чинників, що містилися у супернатантах, останні піддавали термообробці у водяній бані при 80 °С на протязі 10 хв. (E.Gonda et al., 1986). Одержані термостабільні фракції супернатантів використовували для впливу на нейтрофіли одночасно з нативними супернатантами, різницю їх дії відносили до впливу термолабільних чинників.

Нейтрофіли вилучали з периферичної крові, розведеної ізотонічним розчином NaCl 1:1, центрифугуванням у градієнті густини фікол-верографін (1,086 - 1,115 - 1,120 - 1,150) при 1000 g 40 хв. Функціональну активність нейтрофілів досліджували у реакціях міграції під агарозою (J.Palmblad et al., 1981), активації кисеньзалежного метаболізму за НСТ-тестом (H.Friemel, 1987), дегрануляції за вмістом катіонних білків у клітинах (Е.Скрипка, 1983) та активністю кислої фосфатази у позаклітинному середовищі (K.Lam et al., 1978), фагоцитозу за поглинанням латексу (H.Friemel, 1987). Всі методи проводили асептично. До кожної функціональної реакції нейтрофілів проводили негативний контроль на культуральне середовище, не модифіковане клітинами печінки, та позитивний контроль на стандартний стимулятор (0,025 % розчин продигіозану). При обчисленні показників віднімали величину негативного контролю. Для порівняння показники приводили до стандартного вигляду, представляючи їх у відсотках до дії стандартного стимулятора. Результати обробляли загальноприйнятими статистичними методами з використанням критерію t Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

1. МІГРАЦІЙНА АКТИВНІСТЬ НЕЙТРОФІЛІВ ЗА УМОВ ВПЛИВУ СУПЕРНАТАНТІВ ПАРЕНХІМАТОЗНИХ І НЕПАРЕНХІМАТОЗНИХ КЛІТИН ПЕЧІНКИ, ІНТАКТНИХ І ОБРОБЛЕНИХ ГЕПАТОТРОПНИМИ АГЕНТАМИ

За результатами дослідження міграції нейтрофілів через 3, 6, 9, 12, 15, 18 годин після впливу супернатантів клітин печінки та вивчення кінетичних кривих міграції було виявлено, що оптимальний строк дослідження впливу цих супернатантів на хемотаксис нейтрофілів становить 6 годин. У цей строк чітко виявлялися відмінності впливу різних супернатантів на нейтрофіли (мал.1). Інтактні паренхіматозні та не-



Мал. 1. Індекс міграції нейтрофілів за 6 год під впливом супернатантів паренхіматозних (ПК) і непаренхіматозних (НПК) клітин печінки, інтактних (1) і оброблених IgG НКС (2), IgG АПС (3), ССІ₄ (4). А - відстань міграції фронту нейтрофілів; В - число клітин на міграційній доріжці.

паренхіматозні клітини незначно стимулювали міграцію нейтрофілів. За умов впливу IgG НКС на паренхіматозні клітини хемотаксис зростав ($P < 0,01$), а на непаренхіматозні клітини – був вірогідно нижчим ($P < 0,001$). Вплив IgG АГЦС на паренхіматозні клітини викликав вірогідне пригнічення хемотаксису у порівнянні з контрольним до IgG АГЦС впливом IgG НКС ($P < 0,05$). Непаренхіматозні клітини, оброблені IgG АГЦС, пригнічували хемотаксис порівняно з дією інтактних клітин ($P < 0,05$) та паренхіматозних клітин з аналогічним ураженням ($P < 0,01$). Вплив СС14 викликав найбільшу стимуляцію хемотаксису паренхіматозними клітинами ($P < 0,05$ у порівнянні з інтактними клітинами) і непаренхіматозними клітинами ($P < 0,05$ у порівнянні з впливом IgG АГЦС).

2. ФУНКЦІОНАЛЬНІ РЕАКЦІЇ НЕЙТРОФІЛІВ ФАГОЦИТАРНОГО І НЕФАГОЦИТАРНОГО ТИПУ ЗА УМОВ ВПЛИВУ СУПЕРНАТАНТІВ ПАРЕНХІМАТОЗНИХ І НЕПАРЕНХІМАТОЗНИХ КЛІТИН ПЕЧІНКИ. ІНТАКТНИХ І ОБРОБЛЕНИХ ГЕПАТОТРОПНИМИ АГЕНТАМИ

Дегрануляція. Процеси дегрануляції нейтрофілів досліджували за визначенням внутріклітинного вмісту катіонних білків і позаклітинної активності кислої фосфатази через 30 хв після впливу супернатантів.

Вміст катіонних білків у нейтрофілах залишався досить високим при впливі інтактних та оброблених IgG АГЦС і СС14 паренхіматозних клітин (табл.1), але вірогідно знижувався при обробці цих клітин IgG НКС ($P < 0,05$). Непаренхіматозні клітини, інтактні та оброблені IgG АГЦС, продукували термолабільні чинники, які вірогідно знижували показник у порівнянні з дією інтактних паренхіматозних клітин ($P < 0,05$ і

Табл. 1. Вміст катіонних білків у нейтрофілах при впливі паренхіматозних (ПК) і непаренхіматозних (НПК) клітин печінки, інтактних (1), оброблених IgG нормальної кролячої сироватки (НКС), IgG антигепатотоксичної сироватки (АГКС) та СС14, а також контрольних впливах середовища культивування (3) і продигозану (4), середній цитохімічний коефіцієнт, $M \pm m, n=10$

	Супернатант (1)	Термостаб. фракція(2)	P 1-2	P 1-4	P 2-3	P 2-4
ПК _i	89,1±9,8	103,3±11,6		<0,001	<0,001	<0,001
ПКНКС	62,3±7,7	68,9±7,1		<0,01	<0,001	<0,001
ПКАГКС	75,3±5,7	99,4±8,1		<0,001	<0,001	<0,001
ПКСС14	92,8±12,2	100,8±11,5		<0,001	<0,001	<0,001
НПК _i	50,5±9,3	94,0±8,0	<0,05		<0,001	<0,001
НПКНКС	36,9±6,0	58,5±6,3	<0,05		<0,001	<0,01
НПКАГКС	61,0±6,4	90,9±5,7	<0,01	<0,002	<0,001	<0,001
НПКСС14	91,2±8,0	94,1±11,4		<0,001	<0,001	<0,001
3	250,5±12,0	249,9±12,8		<0,001		<0,001
4	28,0±5,3					

Табл. 2. Позаклітинна активність кислої фосфатази при тих же впливах на нейтрофіли, нкат/л, $M \pm m, n=10$

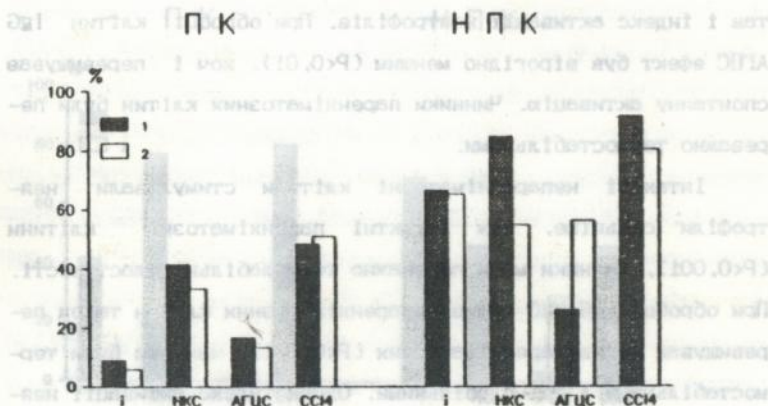
	1	2	P 1-2	P 1-4	P 2-3	P 2-4
ПК _i	15,16±3,20	12,74±2,91		<0,01	<0,01	<0,002
ПКНКС	17,52±3,54	4,49±0,94	<0,01	<0,05		<0,001
ПКАГКС	34,47±5,01	25,51±4,42			<0,001	
ПКСС14	50,85±8,09	42,23±8,58		<0,02	<0,001	
НПК _i	24,87±5,45	4,74±1,08	<0,002			<0,001
НПКНКС	84,72±7,09	16,55±3,84	<0,001	<0,001	<0,01	<0,05
НПКАГКС	43,84±6,50	33,52±4,68		<0,05	<0,001	
НПКСС14	74,93±11,79	41,73±7,24	<0,05	<0,002	<0,001	
3	3,11±0,54	3,03±0,41		<0,001		<0,001
4	28,02±2,20					

$P < 0,01$ відповідно). При обробці непаренхіматозних клітин IgG НКС зниження було найбільшим ($P < 0,05$ у порівнянні з дією аналогічно оброблених паренхіматозних клітин та непаренхіматозних клітин, уражених IgG АГЦС), при цьому виявлено вплив термостабільних і термолабільних чинників. Дія непаренхіматозних клітин, уражених СС14, була подібною до впливу паренхіматозних клітин при аналогічному ураженні, але вірогідно відрізнялася від впливу інтактних і оброблених IgG АГЦС і IgG НКС непаренхіматозних клітин ($P < 0,01$, $P < 0,01$ і $P < 0,001$ відповідно).

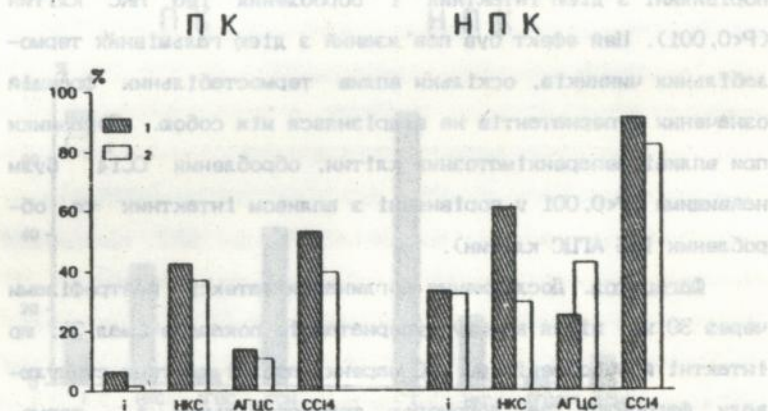
Позаклітинна активність кислої фосфатази (табл.2) при впливі на нейтрофіли супернатантів інтактних та оброблених IgG НКС паренхіматозних клітин була невисокою, у останньому випадку чинники мали термолабільні властивості. Вплив паренхіматозних клітин, уражених IgG АГЦС та СС14, був вірогідно вищим ($P < 0,01$ і $P < 0,001$ відповідно), чинники мали термостабільні властивості. Вплив інтактних непаренхіматозних клітин був подібний до впливу паренхіматозних клітин, оброблених IgG НКС, а при аналогічній обробці непаренхіматозних клітин показники вірогідно зростали ($P < 0,01$) і були найвищими, чинники мали термолабільні і термостабільні властивості. Дія непаренхіматозних клітин при ураженні СС14 перевищувала вплив інтактних та оброблених IgG АГЦС клітин ($P < 0,01$ і $P < 0,05$ відповідно), чинники були термостабільними і термолабільними.

Кисеньзалежний метаболізм. При дослідженні активації кисеньзалежного метаболізму нейтрофілів через 30 хв. після впливу супернатантів виявлено (мал.2), що активація нейтрофілів інтактними паренхіматозними клітинами не відрізня-

Число активованих нейтрофілів



Індекс активації нейтрофілів



Мал. 2. Показники НСТ-тесту нейтрофілів (у процентах до дії продигіозану) при впливі супернатантів (1) та їх термостабільних фракцій (2) від паренхіматозних (ПК) і непаренхіматозних (НПК) клітин печінки, інтактних (і), оброблених IgG нормальної кролячої сироватки (НКС), IgG антигепатоцитотоксичної сироватки (АГЦС) та СС14.

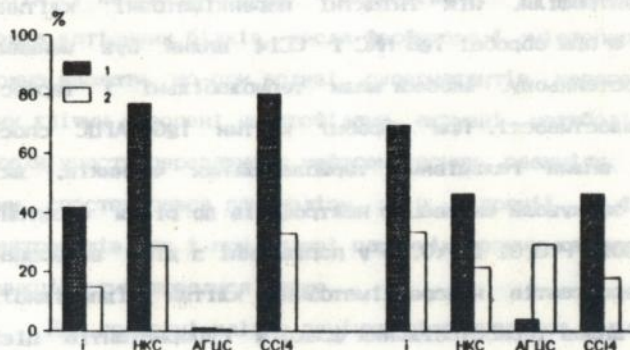
лася від спонтанної, а при обробці CCl_4 і IgG НКС була вірогідно вищою ($P < 0,05$ і $P < 0,01$ відповідно), причому зростає і індекс активації нейтрофілів. При обробці клітин IgG АГЦС ефект був вірогідно меншим ($P < 0,01$), хоч і перевищував спонтанну активацію. Чинники паренхіматозних клітин були переважно термостабільними.

Інтактні непаренхіматозні клітини стимулювали нейтрофіли сильніше, ніж інтактні паренхіматозні клітини ($P < 0,001$), чинники мали переважно термолабільні властивості. При обробці IgG НКС вплив непаренхіматозних клітин також перевищував вплив паренхіматозних ($P < 0,001$), чинники були термостабільними і термолабільними. Однак індекс активації нейтрофілів непаренхіматозними клітинами у цих випадках був невисоким. При дії непаренхіматозних клітин, оброблених IgG АГЦС, кількість активованих нейтрофілів знижувалась у порівнянні з дією інтактних і оброблених IgG НКС клітин ($P < 0,001$). Цей ефект був пов'язаний з дією гальмівних термолабільних чинників, оскільки вплив термостабільних фракцій означених супернатантів не відрізнявся між собою. Показники при впливі непаренхіматозних клітин, оброблених CCl_4 , були найвищими ($P < 0,001$ у порівнянні з впливом інтактних та оброблених IgG АГЦС клітин).

Фагоцитоз. Дослідження поглинання латексу нейтрофілами через 30 хв. після впливу супернатантів показало (мал. 3), що інтактні й оброблені IgG НКС паренхіматозні клітини стимулювали фагоцитоз за допомогою термостабільних і термолабільних факторів. При обробці клітин IgG АГЦС цей ефект повністю нівелювався ($P < 0,001$), а при обробці CCl_4 - був найбільшим, чинники мали переважно термостабільні власти-

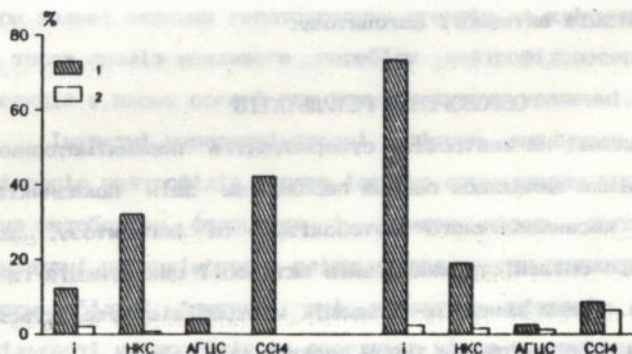
Фагоцитарна активність

П К Н П К



Індекс фагоцитозу

П К Н П К



Мал. 3. Показники фагоцитозу нейтрофілів (у процентах до дії продигіозану) при впливі супернатантів (1) та їх термостабільних фракцій (2) від паренхіматозних (ПК) і непаренхіматозних (НПК) клітин печінки, інтактних (i), оброблених IgG нормальної кролячої сироватки (НКС), IgG антигепатоцитотоксичної сироватки (АГЦС) та СС14

вості, оскільки вплив різних фракцій супернатантів на мав вірогідної різниці.

Інтактні непаренхіматозні клітини більш істотно стимулювали нейтрофіли, ніж інтактні паренхіматозні клітини ($P < 0,05$), а при обробці IgG НКС і СС14 вплив був меншим, подібним останньому. Чинники мали термолабільні і термостабільні властивості. При обробці клітин IgG АГПС спостерігався вплив гальмівних термолабільних чинників, які вірогідно знижували активацію нейтрофілів до рівня спонтанної ($P < 0,001$, $P < 0,01$ і $P < 0,05$ у порівнянні з дією вищеозначених супернатантів непаренхіматозних клітин відповідно), при цьому вплив термостабільних фракцій супернатантів цієї групи був подібним між собою, як це спостерігалось при вивченні кисеньзалежного метаболізму.

Підвищення індексу фагоцитозу понад рівень спонтанної активації у всіх випадках було обумовлене дією термолабільних чинників, що свідчить про існування меншою мірою двох механізмів активації фагоцитозу.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

При впливі на нейтрофіли супернатантів паренхіматозних клітин печінки виявлявся певний паралелізм змін показників міграції, кисеньзалежного метаболізму та фагоцитозу, що свідчить про спільність механізмів активації цих функцій гепатоцитами. Такий механізм активації нейтрофілів уявляється пов'язаним з фагоцитарним типом реакції цих клітин.

На відміну від цього, більш істотна стимуляція кисеньзалежних реакцій нейтрофілів непаренхіматозними клітинами печінки була пов'язана спільними механізмами з процесами

дегрануляції нейтрофілів, а саме з дегрануляцією азу-рофільних гранул. Оскільки спочатку дегранулюють специфічні гранули, які містять основну кількість катіонних білків, а потім (у деяких випадках) - азурофільні, у яких містяться решта катіонних білків, кисла фосфатаза і мієлопероксидаза, можна вважати, що при впливі супернатантів непаренхіматозних клітин утворені нейтрофілами активні метаболіти кисню брали участь переважно у нефагоцитарних реакціях. Разом з цим, спостерігався паралелізм змін міграції і фагоцитозу нейтрофілів, як і при впливі паренхіматозних клітин, хоча ці функції стимулювалися менше.

При ураженні клітин печінки підвищувалася відносна частка нефагоцитарних реакцій нейтрофілів у порівнянні з впливом продуктів інтактних клітин печінки.

Ці узагальнення, однак, не охоплюють можливих варіантів реагування нейтрофілів на вплив тих чи інших продуктів, тому доцільним є розгляд функціональних реакцій нейтрофілів при впливі окремих гепатотропних агентів на клітини печінки, а також аналіз можливого перебігу нейтрофілопосередкованих реакцій у цьому органі при тому чи іншому ураженні.

Інтактні непаренхіматозні клітини викликали незначну міграцію нейтрофілів, проте істотно стимулювали кисеньзалежний метаболізм, фагоцитоз і, меншою мірою, дегрануляцію. Інтактні паренхіматозні клітини продукували термостабільні і термолабільні фактори, які викликали міграцію середньої кількості нейтрофілів та середньою мірою стимулювали їх фагоцитарну активність. При цьому не спостерігалось активації кисеньзалежних реакцій, а також значної дегрануляції азу-рофільних гранул.

Оцінюючи ці дані, треба звернути увагу на те, що серед клітин печінки непаренхіматозні клітини першими контактують з нейтрофілами периферичної крові у печінкових синусоїдах. Залучення невеликої кількості нейтрофілів для виконання фагоцитарних і нефагоцитарних функцій уявляється фізіологічним процесом кооперації та розподілу функцій фагоцитів у зоні судинної стінки. Паренхіматозні ж клітини, які знаходяться за "бар'єром" непаренхіматозних клітин і захищені останніми від впливу патологічних агентів, залучають до тканини печінки середню кількість нейтрофілів для виконання фагоцитарних функцій без активації потужних бактеріцидних систем. При цьому роль термолабільного чинника, який стимулює хемотаксис і фагоцитоз, але не кисеньзалежні реакції, може виконувати IL-8 або споріднений йому цитокін CINC (A. Thornton et al., 1990, 1991; J. Spitzer, P. Zhang, 1995).

Вплив на непаренхіматозні клітини IgG НКС, який є за умов нашого експерименту чужорідним білком, приводив до зниження хемотаксису нейтрофілів, а також їх фагоцитарної активності і, особливо, індексу фагоцитозу. Проте додатково стимулювалися кисеньзалежні реакції та дегрануляція, переважно за рахунок термолабільних факторів. Паренхіматозні клітини за цих умов продукували потужні хемотаксичні фактори, термостабільні чинники, що стимулювали кисеньзалежні реакції і фагоцитарну активність, і термолабільні чинники, які значно активували фагоцитоз і викликали незначну дегрануляцію азурофільних гранул. Одним з таких термолабільних факторів може бути С-реактивний білок, відомий, як білок гострої фази і стимулятор фагоцитозу.

В умовах організму непаренхіматозні клітини активно

зв'язують і елімінують білкові агенти, які надходять через печінкові синусоїди. Залучення до цього великої кількості нейтрофілів, які були б безпосередньо активовані білковим агентом, призвело б до розвитку запалення. Тому пригнічення хемотаксису нейтрофілів непаренхіматозними клітинами за цих умов може запобігати деструкції тканин печінки. У той же час, активація нефагоцитарних функцій цієї обмеженої кількості нейтрофілів сприяє позаклітинному лізису білкових агентів, а активні метаболіти кисню, впливаючи на ендотеліоцити, викликають констрикцію мікросудин печінки (X. Ma et al., 1991; S. Kawamoto et al., 1995), що обмежує надходження агентів.

Паренхіматозні клітини можуть контактувати з білковими агентами тільки за умов блокади функції непаренхіматозного бар'єру, його руйнування або циркуляції агента у кровносно-му руслі. Такі умови є патологічними, а залучення при цьому значної кількості нейтрофілів для заміщення функцій печінкових макрофагів і елімінації білкових агентів треба розглядати як протективне явище. Продукція гепатоцитами С-реактивного білка, концентрація якого в тканинах високо корелює з нейтрофільною інфільтрацією, при цьому викликає гальмування подальшого хемотаксису нейтрофілів і стимуляцію фагоцитозу, обмежуючи розвиток запалення. Ми не спостерігали гальмування хемотаксису у наших експериментах, оскільки нейтрофіли не мали безпосереднього контакту з клітинами печінки і був відсутній сигнал "зворотнього зв'язку" про достатнє залучення нейтрофілів.

На відміну від впливу IgG НКС, вплив протипечінкових антитіл на клітини печінки приводив до переважного приг-

нічення функція нейтрофілів. Непаренхіматозні клітини продукували термостабільні фактори, які спричинювали стимуляцію кисеньзалежних реакцій, фагоцитарну активність та дегрануляцію. Проте їхні термолабільні чинники пригнічували кисеньзалежний метаболізм та фагоцитоз, гальмуючи дію термостабільних факторів. Пригнічення хемотаксису, яке спостерігалося і при впливі нормальних антитіл, поглиблювалося.

Паренхіматозні клітини при дії протипечінкових антитіл продукували термостабільні чинники, які незначно стимулювали кисеньзалежні реакції, дегрануляцію. Фагоцитарна активність пригнічувалася. Хемотаксис знижувався у порівнянні з впливом IgG НКС, однак був більш істотним, ніж при дії супернатантів непаренхіматозних клітин. Підвищення позаклітинної активності ферментів у обох випадках було, очевидно, викликане руйнуванням деякої кількості нейтрофілів, що створювало умови для перебігу реакції нефагоцитарного типу.

Вплив протипечінкових антитіл на клітини печінки у організмі стає можливим, як правило, за умов значного розвитку патологічного процесу у цьому органі. Деструкція клітин посилюється при впливі аутоантитіл, що додатково активує запальні нейтрофілопосередковані реакції, а продукти нейтрофілів пошкоджують інтактні клітини печінки. Це створює вкрай прогностично несприятливу ситуацію. За цих умов пригнічення клітинами печінки додаткового залучення нейтрофілів до патологічного вогнища та гальмування їх функціональної активації є захисною реакцією проти подальшої деструкції тканини печінки. Виділення нейтрофілами, що вже присутні у вогнищі, значної кількості LTB₄ у той же час може сприяти зміні клітинної інфільтрації на макрофагальну (D. Pavan,

E. Goetzl, 1984), а ці клітини теж пригнічують функціональну активацію нейтрофілів.

За даними, які одержано у нашому відділі при вивченні цих же культур клітин печінки (Н. Макогон, И. Алексеєва, 1994), при впливі протипечінкових антитіл спостерігалася продукція лімфоцитстимулюючих гуморальних факторів. Таким чином, можна говорити про диференційовану регуляцію клітинами печінки запальних та імунних процесів з вибірковою пригніченням перших та стимуляцією других, що може мати значення для обмеження та більш сприятливого перебігу патологічного процесу у печінці.

При токсичному ураженні клітин печінки CCl_4 спостерігалася продукція потужних хемотаксичних факторів. Непаренхіматозні клітини, крім того, продукували термостабільні фактори, що значно активували кисеньзалежні реакції, меншою мірою - дегрануляцію та фагоцитоз, і термолабільні фактори, які викликали дегрануляцію азурофільних гранул. Паренхіматозні клітини істотно стимулювали фагоцитоз за допомогою термолабільних та термостабільних чинників, меншою мірою - кисеньзалежні реакції та дегрануляцію за допомогою термостабільних чинників. Значна позаклітинна активність ферментів була пов'язана з швидким руйнуванням нейтрофілів. Це може бути пов'язано з наявністю у супернатантах значної кількості мембранотропних речовин внаслідок дії CCl_4 .

Звертає на себе увагу подібність характеру стимуляції нейтрофілів супернатантами при впливі на клітини печінки CCl_4 і IgG НКС. Відмінність є у більш значній активації хемотаксису нейтрофілів при токсичному ураженні, що є зрозумілим з точки зору необхідності термінової елімінації ток-

сину, та переважно термостабільному характері чинників, оскільки синтез білка при токсичному ураженні клітин печінки знижується (Н.Макогон, И.Алексеева, 1994). Разом з тим, продукти інтенсивних нефагоцитарних реакцій нейтрофілів можуть посилити деструкцію печінки та додатково активувати нейтрофіли, базофіли і макрофаги, що загрожує подальшим розвитком запальних, алергічних та імунних процесів.

ВИСНОВКИ

1. Культивовані паренхіматозні та непаренхіматозні клітини печінки, інтактні та за умов експериментального впливу гепатотропних агентів, продукують термолабільні й термостабільні гуморальні фактори, які модулюють різні функціональні реакції нейтрофілів. При цьому вплив на нейтрофіли паренхіматозних і непаренхіматозних клітин печінки є істотно різним.
2. Паренхіматозні клітини печінки, інтактні та під впливом гепатотропних агентів, більшою мірою активують хемотаксис і фагоцитоз нейтрофілів (реакції фагоцитарного типу), а непаренхіматозні клітини печінки більш істотно стимулюють кисеньзалежний метаболізм і дегрануляцію нейтрофілів (реакції нефагоцитарного типу). При патологічному впливі на обидві групи клітин печінки зростає продукція ними факторів, які спричиняють реакції нейтрофілів нефагоцитарного типу.
3. При впливі нормальних гетерогенних антитіл паренхіматозні та непаренхіматозні клітини печінки продукують чинники, що стимулюють функціональні реакції нейтрофілів. При цьому непаренхіматозні клітини за допомогою термостабільних факторів значно стимулюють реакції нефагоцитарного типу при об-

меженні хемотаксису та фагоцитозу нейтрофілів, а паренхіматозні клітини стимулюють міграцію та фагоцитоз.

4. При дії протипечінкових антитіл паренхіматозні і непаренхіматозні клітини печінки продукують фактори, які пригнічують активацію нейтрофілів. Виявлено продукцію непаренхіматозними клітинами печінки термолабільного фактору (факторів), що гальмує активацію кисеньзалежного метаболізму та фагоцитозу нейтрофілів.

5. За умов впливу тетрахлорметану паренхіматозні та непаренхіматозні клітини печінки продукують переважно термостабільні фактори, які спричиняють значну активацію досліджуваних функцій нейтрофілів. При цьому обидві групи клітин печінки істотно стимулюють міграційну активність нейтрофілів.

6. Гуморальна модуляція функцій нейтрофілів паренхіматозними і непаренхіматозними клітинами печінки за умов впливу патологічного агента може бути важливою ланкою патогенетичних механізмів розвитку нейтрофілопосередкованих реакцій у печінці при її патології.

ПЕРЕЛІК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Алексеева І.М., Бризгіна Т.М., Павлович С.І., Макогон Н.В., Мартинова Т.В., Портниченко А.Г. Роль фізіологічно активних речовин, що виділяють клітини печінки при її експериментальних ураженнях, в активації імунної системи // Фундаментальні механізми розвитку патологічних процесів: Тези доп. Конференції науково-медичного товариства патофізіологів України. - Дніпропетровськ, 1992. - С. 7.

2. Портниченко А.Г., Алексеева І.М. Зміни функціональної активності нейтрофілів під впливом факторів, що їх проду-

кують клітини печінки мишей за умов експериментального ураження // Клітинні та молекулярні механізми розвитку патологічних процесів: Тез. доп. Пленуму науково-медичного товариства патолофізіологів України.- Львів, 1993.- С. 32.

3. Портниченко А.Г. Регуляция функциональной активности нейтрофилов факторами, выделяемыми интактными и поражёнными клетками печени мышей // Системно-антисистемная регуляция в норме и патологии: Научн. труды (доклады и материалы) 3-го Международного симпозиума "Системно-антисистемная регуляция в живой и неживой природе".- Киев, 1993.- С. 101-103.

4. Портниченко А.Г., Макогон Н.В., Алексеєва І.М. Зміни функціональної активності нейтрофілів під впливом факторів, що виділяються інтактними та ураженими клітинами печінки мишей // Фізіол. журн.- 1993.- Т.39, № 5-6.- С. 46-52.

5. Алексеєва І.М., Макогон Н.В., Портниченко А.Г., Лушнікова І.В. Зміни активності імункомпетентних клітин під впливом речовин, що виділяють паренхіматозні та непаренхіматозні клітини печінки // Тези доп. 14 з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. І. П. Павлова.- Київ, 1994.- С.181.

6. Портниченко А.Г., Алексеєва І.М. Особливості активації функцій нейтрофілів паренхіматозними та непаренхіматозними клітинами печінки мишей за умов їх токсичного ураження // Доповіді НАН України.- 1995, № 11.- С. 142-145.

7. Портниченко А.Г. Модуляція функцій нейтрофілів мишей гуморальними чинниками непаренхіматозних клітин печінки, інтактних та за умов імунного впливу // Фізіол. журн.- 1996.- Т.58, N 1-2.- С. 120-126.

Portnychenko A.G. Peculiarities of humoral modulation of neutrophil functions by intact or injured parenchymatous and nonparenchymatous liver cells. The dissertation (manuscript) is presented in accordance with requirements for the degree of candidat of medical sciences in the speciality 14.03.05.- Pathologic Physiology. A.A. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 1996.

We have studied chemotaxis, oxygen-dependent metabolism, degranulation and phagocytose of isolated peripheral blood neutrophils caused by cultural supernatants of intact or treated with hepatotropic agents parenchymatous and nonparenchymatous mouse liver cells. It was shown that the liver cells produce a number of thermostabile and thermolabile humoral factors to modulate of neutrophil functions, the influence of parenchymatous and nonparenchymatous cells is significantly distinct. Treatment of liver cells with tetrachlormetan or normal heterogeneic antibodies results in stimulating of neutrophil functions. In contrast, liver cells treated with anti-liver antibodies inhibit of neutrophil activation. These mechanisms can determine a development of pathologic processes in liver.

Портниченко А.Г. Особенности гуморальной модуляции функций нейтрофилов паренхиматозными и непаренхиматозными клетками печени в норме и при патологии. Диссертация (рукопись) на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.05 – патологическая физиология. Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, 1996.

Исследовали гуморальное влияние культивируемых паренхиматозных и непаренхиматозных клеток печени мышей, интактных и при воздействии гепатотропных агентов, на хемотаксис, кислородзависимый метаболизм, дегрануляцию и фагоцитоз изолированных нейтрофилов периферической крови. Показано, что клетки печени продуцируют термостабильные и термолабильные гуморальные факторы, модулирующие функциональные реакции нейтрофилов, причем влияние паренхиматозных и непаренхиматозных клеток печени существенно отличается. При воздействии на клетки печени тетрахлорметана или нормальных гетерогенных антител функциональные реакции нейтрофилов стимулируются, обратный эффект наблюдается при влиянии на клетки печени противопеченочных антител. Проанализировано возможное участие этих механизмов в патогенезе заболеваний печени.

Ключові слова: нейтрофіл, паренхіматозні та непаренхіматозні клітини печінки, тетрахлорметан, протипечінкові антитіла.

AB.55.741
AB 35.741

Підп. до друку 300996 Формат 60x84/16. Папір офс. 2 Друк. офс.
Друк. офс. Умовн. друк. арк. 15, Обл.-вид. арк. Тир. 100
Зам. 6-1581.

Київська книжкова друкарня наукової книги. Київ, Б. Хмельницького, 19.