

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ. 1999

УДК 612.35.014.08

Л. Е. Панин, В. Ф. Максимов, И. М. Коростышевская

РОЛЬ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ПЕЧЕНИ ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ КООПЕРАТИВНОГО ЭФФЕКТА ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ И ЛИПОПРОТЕИНОВ КРОВИ

Институт биохимии Сибирского отделения РАН (дир. — акад. РАН Л. Е. Панин)

Получены ультраструктурные подтверждения, свидетельствующие о существовании функциональных связей между непаренхимными клетками печени и гепатоцитами при обмене глюкокортикоидов и липопротеинов (ЛП) крови. Стимуляция макрофагов липополисахаридами вызывает параллельное снижение концентрации глюкокортикоидов в крови и доли ЛПВ₃ и ЛПНП в липопротеиновом спектре. В опытах *in vitro* показано, что при этом резко усиливаются захват и трансцитоз меченых ЛП через синусоидные клетки, особенно ЛПВ₃. Морфологическим проявлением кооперативного эффекта глюкокортикоидов и ЛПВ₃ в большей степени, чем глюкокортикоидов и ЛПНП, является изменение ядерного аппарата гепатоцитов. При стимуляции макрофагов в ядрах увеличивается относительный объем ядрышек и содержание гранулярного вещества в них, а также плотность поровых комплексов. Эти перестройки являются необходимым условием для экспрессии генов и усиления синтеза белка в гепатоцитах.

Ultrastructural studies confirmed the functional relationship between the nonparenchymatous cells of the liver and hepatocytes during blood glucocorticoid and lipoprotein metabolism. Lipopolysaccharide stimulation of macrophages induced a parallel decrease in the blood glucocorticoid concentration and share of HDLP₃ and LDLP in the lipoprotein spectrum. *In vitro* experiments demonstrated that it involved a sharp increase in the capture and transcytosis of labeled lipoproteins (particularly HDLP₃) through sinusoidal cells. Alteration of the hepatocyte nuclei is a morphological manifestation of the cooperative effect of glucocorticoids and HDLP₃ and less so of the joint effect of glucocorticoids and LDLP. Stimulation of macrophages leads to an increase in the relative volume of the nucleoli in the nuclei and in the content of the granular substance in them, and in the compactness of porous complexes. These rearrangements are an obligatory condition for gene expression and intensification of protein production in hepatocytes.

Известно, что между клетками печеночного синусоида и гепатоцитами существуют многочисленные функциональные связи. Особый интерес представляют взаимодействия между резидентными макрофагами (клетками Купфера) и гепатоцитами в обмене стероидных гормонов. Показано, что в макрофагах глюкокортикоиды подвергаются восстановлению при участии 5 α - и 5 β -редуктаз с образованием тетрагидросоединений, при этом восстанавливается Δ^4 , 3-кетогруппа в кольце А [13]. Ранее предполагалось, что тетрагидросоединения не обладают функциональной активностью, в гепатоцитах они трансформируются в глюкурониды и в таком виде выводятся из организма [10].

Функциональные связи между макрофагами и гепатоцитами проявляются также при обмене липопротеинов (ЛП). Клетки Купфера захватывают как модифицированные, так и интактные ЛП, которые в них подвергаются неполной деградации [2]. Показано, что после захвата ЛП высокой плотности 3-го подкласса (ЛПВ₃) и кортизола макрофаги ресекретируют аполипипротенин А-1 и тетрагидрокортизол. Комплекс этих соединений повышает биосинтез белка в гепатоцитах, т. е. проявляется кооперативный эффект, не характерный для каждого отдельно взятого компонента [6, 7].

В данном исследовании прослежены некоторые биохимические изменения в крови и ультраструктурные изменения в клетках печени при анализе коопе-

ративного эффекта глюкокортикоидов с ЛПВ₃ и с ЛП низкой плотности (ЛПНП).

Материалы и методы

Работа выполнена на крысах-самцах Вистар массой 180—200 г. В сыворотке крови определяли липопротеиновый спектр с помощью электрофореза в полиакриламидном геле [11] и содержание 11-оксикортикостероидов (11-ОКС) флюориметрическим методом [8] через 24 и 72 ч после стимуляции резистентных макрофагов липополисахаридом (ЛПС) бактериального происхождения. В качестве последнего использовали продигиозан ("Мосхим-фармпрепарат") в дозе 0,25 мг/кг внутривенно.

Для морфологических исследований животных забивали под эфирным наркозом, после чего печень *in situ* отмывали фосфатным буфером от крови. Перфузию изолированной печени проводили *in vitro* при 37°C 10, 30 и 60 мин в замкнутой системе объемом 25 мл через *v. porta* средой Игла рН 7,4, содержащей 20 мМ НЕРЕС, 10 мкМ кортизола и конъюгаты коллоидного золота с ЛП из расчета 100 мкг белка на 1 мл среды. Для стимуляции макрофагов в параллельных сериях в перфузат вносили продигиозан (20 мг/мл). Коллоидное золото с размером частиц 9—10 нм получали по методу Frens [9]. Нативные ЛПНП ($d = 0,95 - 1,006$ г/мл) и ЛПВ₃ ($d = 1,125 - 1,21$ г/мл) выделяли из сыворотки крови крыс методом изоплотного ульт-

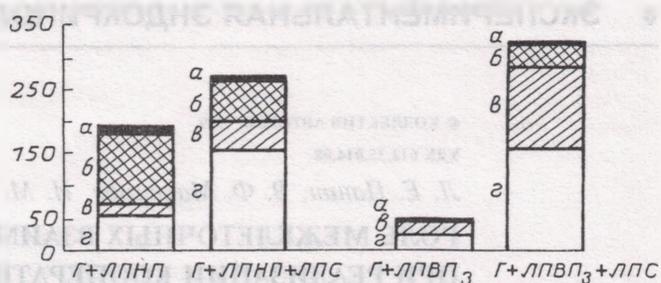
рацентрифугирования [12]. Авторы выражают глубокую благодарность Г. В. Правоторову и И. Ф. Усынину за организацию эксперимента.

Для электронно-микроскопического исследования материал фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида, дофиксировали в 1,5% растворе OsO_4 , заливали в смесь эпона с аралдитом. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали в электронном микроскопе JEM100SX при увеличении 5000—30 000. Количественно оценивали распределение метки между клетками печени. Стереоморфометрию проводили только в тех ядрах гепатоцитов, в срез которых попало ядрышко. Измеряли диаметр ядер, относительные объемы эухроматина, гетерохроматина и ядрышка. Отдельно учитывали относительный объем гранулярного вещества в ядрышках. В каждом ядре считали число ядерных пор по срезу оболочки и выражали их плотность в расчете на 10 мкм ее длины. Статистическую обработку данных проводили в пакете Statgraphics 4.0, уровень достоверности принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

Проведенные ранее исследования показали, что в реализации кооперативного эффекта глюкокортикоидов и ЛПВП₃ активную роль играют макрофаги печени, а основным его проявлением является усиление биосинтеза белка в гепатоцитах [3, 4]. Функциональная взаимосвязь гормонов и ЛП в крови проявляется в одновременном снижении содержания глюкокортикоидов, доли ЛПВП₃ и ЛПНП в липопротеиновом спектре после введения животным ЛПС. Именно стимуляция ЛПС ретикулоэндотелиальной системы делает заметным одновременный захват обоих соединений. Относительное содержание других ЛП (высокой плотности 2-го подкласса — ЛПВП₂ и очень низкой плотности — ЛПОНП) в этих условиях увеличивалось (табл. 1).

Результаты подсчета метки на ультратонких срезах в экспериментах с перфузией печени показали, что основная масса меченных коллоидным золотом ЛПВП₃ и ЛПНП захватывается эндотелиоцитами и макрофагами с помощью рецепторно-обусловленного эндоцитоза. В эндотелиоцитах трансцитоз ЛП осуществляется в составе эндосом. Этот механизм внутриклеточного перемещения, вероятно, не приводит к существенным изменениям структуры ЛП. В макрофагах метка накапливается преимущественно в лизосомах. Биохимически было показано, что в лизосомах полной деградации ЛП не происходит. Освобождающиеся аполипопротеины, обладающие выраженными детергентными свойствами, легко проникают за пределы вторичных лизосом [5].



Количество и распределение меченных коллоидным золотом липопротеинов между клетками печени (усредненные данные за 10—60 мин перфузии средой Игла с добавлением глюкокортикоидов).

а — гепатоцит; б — вне клеток; в — эндотелий; г — макрофаг. По оси ординат — число на единицу площади.

Эндосомы и вторичные лизосомы могут открываться на базальной поверхности клеток, освобождая свое содержимое в интерстициальное пространство. В макрофагах также происходит ферментативная модификация стероидных гормонов, связанная с восстановлением Δ^4 , 3-кетогруппы в кольце А, что было показано ранее другими авторами [13].

Рецепторно-обусловленный эндоцитоз ЛП значительно усиливается как в эндотелиоцитах, так и в макрофагах под влиянием ЛПС (см. рисунок). Данный эффект наиболее ярко выражен, когда перфузия проводилась глюкокортикоидами и ЛПВП₃. Оказалось, что уже через 10 мин перфузии 70% всей метки обнаруживалось во вторичных лизосомах макрофагов. В дальнейшем метка распределялась более равномерно между синусоидными клетками. Через 60 мин она уже появлялась в пространстве Диссе. В гепатоцитах обнаруживалось не более 7% метки. Это свидетельствует о том, что в присутствии глюкокортикоидов стимулированные синусоидные клетки значительно активнее захватывают и переносят ЛП из крови в интерстиций. При этом вполне возможно, что их связь с частицами коллоидного золота теряется.

Морфометрические исследования показали, что при перфузии печени средой Игла с добавлением кортизола и ЛПВП₃ или кортизола и ЛПНП не происходит существенных изменений в ядрах гепатоцитов. Однако ситуация оказалась существенно иной, когда перфузию осуществляли в присутствии ЛПС (табл. 2). При стимуляции макрофагов отмечалось достоверное увеличение относительного объема ядрышек и содержания гранулярного компонента в них. Особенно ярко это проявилось при использовании глюкокортикоидов и ЛПВП₃ по сравнению с ЛПНП; кроме того, обнаруживалось достоверное увеличение плотности ядерных пор и

Таблица 1

Изменение липопротеинового спектра (в %) и содержания 11-ОКС (в мг%) в сыворотке крови после введения ЛПС ($M \pm m$)

Условия опыта	ЛПВП ₂	ЛПВП ₃	ЛПНП	ЛПОНП	11-ОКС
Интактные животные ($n = 17$)	28,8 ± 1,4	51,3 ± 1,9	16,0 ± 1,2	4,0 ± 0,6	138,4 ± 0,4
24 ч после введения ЛПС ($n = 16$)	35,9 ± 1,6*	42,1 ± 2,0*	16,7 ± 1,2	5,3 ± 0,9	70,0 ± 1,3*
48 ч после введения ЛПС ($n = 5$)	47,7 ± 3,0*	35,2 ± 3,8*	6,3 ± 1,3*	10,7 ± 1,3	68,0 ± 0,6*

Примечание. * — достоверность ($p < 0,05$) средних различий с интактными животными.

Морфометрические показатели ядер гепатоцитов при перфузии печени крыс средней Игла с глюкокортикоидами и ЛП ($M \pm m$)

Условия эксперимента	Ядро				Ядрышко
	диаметр, мкм	относительный объем, %		плотность пор на 10 мкм оболочки	
		эхроматина	ядрышка		
Интактная печень	7,3 ± 0,15	71,4 ± 0,68	8,0 ± 0,52	2,7 ± 0,13	34,6 ± 2,11
Г + ЛПНП**	7,7 ± 0,23	68,8 ± 1,32	8,6 ± 1,69	2,8 ± 0,17	39,5 ± 1,96
Г + ЛПВП ₃ **	7,1 ± 0,15	73,7 ± 0,68	8,4 ± 0,59	3,0 ± 0,15	46,6 ± 1,93*
Г + ЛПНП + ЛПС**	7,2 ± 0,18	68,8 ± 0,90	10,4 ± 0,70*	2,4 ± 0,13	46,9 ± 2,16*
10 мин	7,2 ± 0,28	70,6 ± 1,46	9,0 ± 1,08	2,6 ± 0,24	45,9 ± 2,60
30 мин	6,9 ± 0,32	64,7 ± 1,19	12,7 ± 1,13	2,6 ± 0,26	47,4 ± 5,93
60 мин	7,7 ± 0,29	71,4 ± 1,24	9,6 ± 1,23	2,1 ± 0,16	47,7 ± 1,55
Г + ЛПВП ₃ + ЛПС**	6,6 ± 0,16*	68,4 ± 0,85	11,1 ± 0,58*	5,1 ± 0,34*	69,9 ± 3,52*
10 мин	6,5 ± 0,20	68,5 ± 1,46	11,6 ± 1,11	3,3 ± 0,24	84,3 ± 1,06
30 мин	7,0 ± 0,27	66,6 ± 1,41	10,7 ± 0,69	7,3 ± 0,46	83,7 ± 1,09
60 мин	6,2 ± 0,24	70,6 ± 1,44	11,1 ± 1,02	4,8 ± 0,36	38,4 ± 2,46

Примечание. * — достоверность различий средних ($p < 0,05$) с интактной печенью; ** — усредненные результаты за время перфузии от 10 до 60 мин. Г — глюкокортикоид

прослеживалась четкая динамика всех показателей. Уже через 10 мин перфузии относительный объем ядрышек и содержание гранулярного вещества в них достигали максимальных значений. Фибриллярный компонент выглядел рыхлым, мелкозернистым, в нем выявилось много фибриллярных центров. Ядрышки приобретали нуклеонемное строение. Такие изменения, согласно общепринятым критериям, свидетельствуют об активном формировании незрелых субъединиц рибосом [1]. Через 30 мин перфузии все признаки активации ядер сохранялись. Более того, в ядерных мембранах более чем в 2 раза увеличивалась плотность поровых комплексов, что создавало необходимые предпосылки для быстрой доставки в цитоплазму продуктов синтетической активности ядрышек. Через 60 мин перфузии высокий относительный объем ядрышек сохранялся, однако содержание гранулярного вещества в нем значительно снижалось. Одновременно на ядерной мембране уменьшалась плотность пор, оставаясь выше контрольных показателей. Эти перестройки являются необходимым условием для усиления синтеза белка в гепатоцитах.

Выводы

1. Получены ультраструктурные подтверждения, свидетельствующие о существовании функциональных связей между непаренхимными клетками печени и гепатоцитами при обмене глюкокортикоидов и ЛП крови.

2. Стимуляция макрофагов ЛПС вызывает параллельное снижение концентрации глюкокортикоидов и доли ЛПВП₃ и ЛПНП в липопротеиновом спектре крови. В опытах *in vitro* показано, что при этом резко усиливаются захват и трансцитоз меченых ЛП через синусоидные клетки, особенно ЛПВП₃.

3. Морфологическим проявлением кооперативного эффекта глюкокортикоидов и ЛПВП₃, а также глюкокортикоидов и ЛПНП являются структурно-функциональные изменения ядер гепатоцитов. При стимуляции макрофагов ЛПС в ядрах гепатоцитов увеличиваются относительный объем ядрышек и содержание гранулярного вещества в них, а также плотность поровых комплексов, что указывает на усиление экспрессии генов, в первую очередь входящих в ядрышковую ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

- Збарский И. Б. Организация клеточного ядра. — М., 1988.
- Маянский Д. Н., Виссе Э., Декер К. Новые рубежи в гепатологии. — Новосибирск, 1992.
- Панин Л. Е., Усынин И. Ф., Поляков Л. М. // *Вопр. мед. химии.* — 1986. — Т. 32, № 4. — С. 106—110.
- Панин Л. Е., Маянская Н. Н. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении. — Новосибирск, 1987.
- Панин Л. Е. // *Вопр. мед. химии.* — 1990. — Т. 36, № 6. — С. 2—4.
- Панин Л. Е. // *Эндокринные механизмы регуляции функций в норме и патологии.* — Новосибирск, 1997. — С. 117—118.
- Панин Л. Е., Гимаутдинова О. И., Поляков Л. М., Найкина Т. Н. // *Молекул. биол.* — 1998. — Т. 32, № 3. — С. 447—451.
- Панков Ю. А., Усватова И. Я. // *Методы исследования некоторых гормонов и медиаторов.* — М., 1965. — С. 137—145.
- Правоторов Г. В., Усынин И. Ф., Поляков Л. М., Глазырин А. Л. // *Цитология.* — 1993. — Т. 35, № 11—12. — С. 42—44.
- Юдаев Н. А., Афиногенова С. А., Крекова М. А. // *Биохимия гормонов и гормональной регуляции.* — М., 1976. — С. 171—227.
- Davis D. J. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1964. — Vol. 121. — P. 404—427.
- Hatch F. T., Lees R. S. // *Advanc. Lipid Res.* — 1968. — Vol. 6. — P. 2—68.
- Sawyer N. J., Oliver J. T., Troop R. S. // *Steroids.* — 1963. — Vol. 2. — P. 213—227.

Поступила 26.01.99