

Н.В. Макогон, С.І. Павлович, Т.М. Бризгіна, Л.І. Алексюк, В.С. Сухіна,
Н.Г. Грушка, І.М. Алексєєва

Проліферація та загибель мононуклеарних клітин печінки мишей за умов її імунного ураження, викликаного введенням конканаваліну А або протипечінкових антитіл

С целью изучения иммунных механизмов патологии печени исследовали мононуклеарные клетки, выделенные из печени, при двух видах ее иммунного повреждения у мышей: клеточного генеза – введение конканавалина А (КонаА) и антительного генеза – введение противопеченочных антител (ППА, γ -глобулиновой фракции сыворотки кроликов, иммунизированных тканью печени мышей). Установлено, что оба вида повреждения сопровождались активацией иммунных процессов в ткани печени, что проявлялось в усилении пролиферации мононуклеаров, оцениваемой с помощью моноклональных антител ИПО-38. При действии ППА, в отличие от КонаА, активация иммунных процессов проявлялась также в повышении процента плазматических клеток и более дифференцированных малых лимфоцитов среди мононуклеаров печени. Вместе с тем при введении КонаА наблюдалось более выраженное усиление апоптоза и некроза мононуклеаров печени. Это соотносилось с намного большей при действии КонаА экспрессией Fas-рецептора клеточной гибели на мононуклеарах печени. Таким образом, показано, что соотношение процессов пролиферации и гибели мононуклеарных клеток печени в условиях ее повреждения Т-клеточного генеза сдвигается в сторону существенного усиления апоптотической и некротической клеточной гибели, в частности Fas-опосредованной, тогда как в условиях повреждения антителами в большей мере выражены процессы пролиферации и активации иммунокомпетентных клеток.

ВСТУП

Серед захворювань печінки виділяють групу аутоімунних, таких, як первинний біліарний цироз, аутоімунні гепатити типу 1 і 2, первинний склерозуючий холангіт [7,12,18]. Імунні процеси відіграють важливу роль у механізмах ушкодження печінки і при інших її захворюваннях. Встановлено активну участь Т-клітин, зокрема Т-хелперів і природних Т-кілерів, у патогенезі аутоімунного гепатиту [7,12,17]. Про участь гуморальної ланки імунної системи в ушкодженні печінки свідчить збільшення кількості плазматичних клітин у ній, гіпергамаглобулінемія та наявність анти-

печінкових антитіл [12,18,19]. Ідентифіковано молекули, до яких виявляють антитіла при певних типах аутоімунних патологій. Механізми розвитку аутоімунних захворювань печінки потребують подальшого дослідження. Порушення клітинного гомеостазу імунної системи, який забезпечує необхідний баланс між проліферацією, диференціацією та загибеллю імунокомпетентних клітин, є одним з механізмів, що лежить в основі аутоімунних захворювань.

Імунокомпетентні клітини є складовою частиною непаренхімних клітин печінки (до 25 %). Співвідношення різних популяцій лімфоцитів у цьому органі суттєво відрізняється від такого в крові [8,12,14]. Це

© Н.В. Макогон, С.І. Павлович, Т.М. Бризгіна, Л.І. Алексюк, В.С. Сухіна, Н.Г. Грушка, І.М. Алексєєва

потребує вивчення стану саме імункомпетентних клітин печінки за нормальних і патологічних умов, зокрема їх проліферації та загибелі при розвитку імунного ураження.

Існують такі експериментальні моделі вивчення аутоімунного ушкодження печінки, як індукція гепатиту за допомогою Т-клітинного мітогена конканаваліну А (КонА) [16,17], імунізація тварин тими чи іншими фракціями аlogenної або ксеногенної печінки [9,10], введення ксеногенних протипечінкових антитіл [19,20] тощо. Всі розроблені моделі мають обмеження та повністю не відтворюють процеси при аутоімунних захворюваннях печінки людини. Однак вони дають змогу відокремити та вивчити роль того чи іншого компонента в розвитку імунного ушкодження, зокрема клітинного й антитільного.

Метою нашої роботи було вивчення проліферації і загибелі мононуклеарних клітин печінки за умов її експериментального імунного ушкодження: 1) Т-клітинного генезу, викликаного активацією Т-клітин за допомогою поліклонального Т-клітинного мітогена КонА, і 2) антитільного генезу, викликаного введенням протипечінкових антитіл (ППА), отриманих у ксеногенній системі.

МЕТОДИКА

Досліди проводили на статевозрілих самцях мишей лінії СВА масою 18–22 г. При роботі дотримувалися положень Конвенції з біоетики Ради Європи (Страсбург, 1997).

ППА отримували за допомогою внутрішньовенної імунізації кролів породи шиншила екстрактом печінки мишей. Печінку відмивали від крові перфузією забуференим фосфатами фізіологічним розчином (ЗФР), гомогенізували та центрифугували 20 хв при 800 g. У супернатанті визначали вміст білка за методом Лоурі [11] і використовували для імунізації кролів, яку проводили чотириразово, через 2 доби на 3-тю, в дозі 12, 20, 24 і 28 мг білка/кг маси

кроля. Сироватку отримували на 7–8-му добу після останньої імунізації. Титр протипечінкових антитіл у сироватці визначали в реакції зв'язування комплекта [1]; він становив 1:400 – 1:640. Із сироваток за методом висолювання сірчанокислим амонієм [1] виділяли γ -глобулінову фракцію, яку надалі використовували як ППА.

Схема експерименту: для моделювання імунного ушкодження печінки Т-клітинного і антитільного генезу вводили відповідно КонА (0,6 мг/20 г) і ППА (4,5 мг/20 г) одноразово в хвостову вену. Через 20 год тварин піддавали ефірному наркозу і вилучали матеріал для дослідження. Контрольними були тварини, яким вводили фізіологічний розчин у відповідному об'ємі.

Печінку фіксували 10%-м нейтральним формаліном, заливали в парафін за загальноприйнятою методикою, гістологічне дослідження тканини печінки проводили при забарвленні препаратів гематоксилін-еозином, дослідження клітин крові – при забарвленні мазків за Романовським. У сироватці мишей визначали активність аланінамінотрансферази (АЛТ) [2].

Для виділення мононуклеарів печінки [8] її перфузували холодним ЗФР (10 мл), подрібнювали ножицями в середовищі виділення (RPMI-1640 з 5 % інактивованої ембріональної телячої сироватки) і протирали через сито (200 меш, "Sigma", США). Далі осаджували гепатоцити (50 g, 30 с). Супернатанти центрифугували при 500 g, 7 хв, осад ресуспендували в 35%-му (в кінцевій концентрації) розчині Percoll ("Sigma", США), що містив 100 од/мл гепарину. Дану суспензію клітин наносили поверх 70%-го розчину Percoll, зверху наносили середовище виділення та центрифугували при 800 g 20 хв. Фракцію клітин між 70 і 35%-м розчином Percoll відмивали в ЗФР (500 g, 7 хв) і використовували для наступних досліджень. В отриманій суспензії мононуклеарів печінки проводили лізис

еритроцитів протягом 20 с у дистильованій воді з подальшим відновленням осмолярності середовища. За результатами цитологічної оцінки мононуклеари становили 96–99 % загальної кількості виділених клітин забарвлених за методом Романовського, з них – 91–94 % – лімфоцити та 5–6 % – моноцити/макрофаги.

Імуноцитохімічне дослідження з визначенням відсотка клітин, що експресували Fas (CD 95), проводили з використанням моноклональних антитіл, мічених фікоеритрином (“BD Biosciences Pharmingen”, США) в розведенні 1:200. Забарвлення суспензії мононуклеарних клітин печінки проводили в ЗФР з 0,1%-м азидом натрію і 1%-м бичачим сироватковим альбуміном при 8°C протягом 16 год з наступним двократним відмиванням ЗФР. Як негативний контроль використовували антитіла того самого ізотипу (IgG_{2b}), що й анти-Fas-антитіла. Оцінку проліферативної активності мононуклеарів, виділених з печінки, проводили непрямим імуофлуоресцентним методом з використанням моноклональних антитіл IPO-38 (Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім.Р.Є. Кавецького НАН України) [4]. Ці антитіла виявляють ядерний антиген (антиген проліферуючих клітин – АПК), експресія якого пов’язана з проліферацією клітин, починаючи з ранньої G1-фази мітотичного циклу і сягає максимуму у мітозі [4,13]. Клітини інкубували на скельцях, покритих розчином полі-L-лізину в ЗФР упродовж 40 хв при 37°C, далі 20 хв при 4°C. Скельця промивали, клітини фіксували 3,7%-м розчином параформальдегіду на ЗФР протягом 5 хв, обробляли 0,2%-м розчином тритону X-100 упродовж 7 хв, промивали ЗФР і інкубували з IPO-38 (30 хв при 4°C). Як вторинні антитіла використовували FITC-кон’юговані козині антитіла до мишачих імуноглобулінів. Підраховували кількість клітин, що експресували Fas і АПК з диференціацією за ступенем світін-

ня. Визначали відсоток клітин, що експресували АПК і Fas, від загальної кількості мононуклеарних клітин печінки, а також середній цитохімічний коефіцієнт [6] за формулою $(0xA+1xB+2xV+3xГ+4xD)/100$, де 0,1,2,3,4 – ступінь світіння, А,Б,В,Г,Д – кількість клітин відповідної інтенсивності світіння.

Оцінку апоптотичної та некротичної загибелі клітин здійснювали за морфологічними ознаками методами: 1) забарвлення отриманої суспензії трипановим синім, що дає змогу встановити загальний відсоток клітин з ушкодженими плазматичними мембранами, тобто сумарний первинний і вторинний некроз; 2) методом прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот Хехст 33342 і йодид пропідіума [15]. Останній проникає лише у клітини з ушкодженими мембранами і забарвлює їх ядра в оранжевий колір. Хехст 33342 проникає і через неушкоджені мембрани і забарвлює ядра живих клітин в зелено-синій колір. Зв’язані з хроматином барвники дають змогу оцінити морфологічні ознаки ядерного матеріалу, притаманні апоптозу: периферичне розташування хроматину, його конденсацію, фрагментацію ядер, а також розпад клітин на апоптотичні тільця. Визначаються також клітини з ознаками вторинного постапоптотичного некрозу. Забарвлення проводили в ЗФР з барвниками в кінцевій концентрації 10 мкмоль/л у темряві протягом 25 хв. Клітини відмивали в ЗФР центрифугуванням (500 g, 7 хв), фіксували 5%-м формаліном в ЗФР 2 хв. Після відмивання в ЗФР клітини ресуспендували та робили мазки. Імуноцитохімічні та морфологічні дослідження проводили на люмінесцентному мікроскопі „Люмам И-1” з водно-імерсійним об’єктивом х85, оцінювали не менш як 100 клітин. Використовували відеосистему передачі зображення з мікроскопа на комп’ютер.

Статистичну обробку результатів експериментів проводили за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з наступним порівнянням середніх значень між групами за тестом Ньюмена-Кейлса з використанням програми STATISTICA.6; $P < 0,05$ вважалося статистично вірогідним. Перед статистичним аналізом до всіх результатів, виражених у відсотках, застосовували арксинус-перетворення за Фішером ($y_i = 2 \arcsin \sqrt{x_i/100}$; величина y_i має розподіл, близький до нормального) [3].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Установлено, що КонА та ППА спричиняли ушкодження печінки за результатами гістологічних досліджень і за активністю АЛТ у сироватці крові. Обидва впливи призводили до ураження печінки, як паренхіми органа, так і його мікроциркуляторного русла. Характерною для обох впливів була білкова дистрофія гепатоцитів з цитолізом і некробіозом окремих клітин, однак ступінь цитолітичних змін і реакція зірчастих ретикулоендотеліоцитів були більш виражені у разі дії КонА. Істотне порушення балочної структури та дисконплексація гепатоцитів, що спостерігалися при дії ППА, було майже відсутнім за умов

впливу КонА. Порушення мікроциркуляції мало як спільні морфологічні риси (розширення судин різного калібру, навколосинусоїдальних просторів, зміни гістоструктури судинних стінок з набряком ендотеліоцитів), так і більш характерні для одного з видів ушкодження. При дії КонА спостерігались окремі локуси геморагічного просякання паренхіми печінки, була сильнішою реакція клітин-ефекторів запалення (наявність сегменто- і паличкоядерних нейтрофільних гранулоцитів у просвіті судин і у складі інфільтратів). У разі дії ППА частіше спостерігалось утворення лімфоцитарно-гістіоцитарних інфільтратів із наявністю макрофагоцитів і плазмоцитів, властивих імунному запаленню. Збільшення кількості плазматичних клітин у печінці є характерною ознакою аутоімунного гепатиту [18].

Активність АЛТ підвищувалася порівняно з контролем при дії КонА і ППА в 3,7 раза ($P < 0,001$) і в 1,9 раза ($P < 0,01$) відповідно. Обидва впливи призводили до запальних процесів (за підвищенням відсотка паличкоядерних нейтрофілів у крові), однак при дії КонА відсоток паличко- і сегментоядерних нейтрофілів був вірогідно більшим, ніж при дії ППА, а відсоток лімфоцитів – меншим (рис.1). Таким чином, ушкодження печінки Т-клітинного генезу мало більш виражений

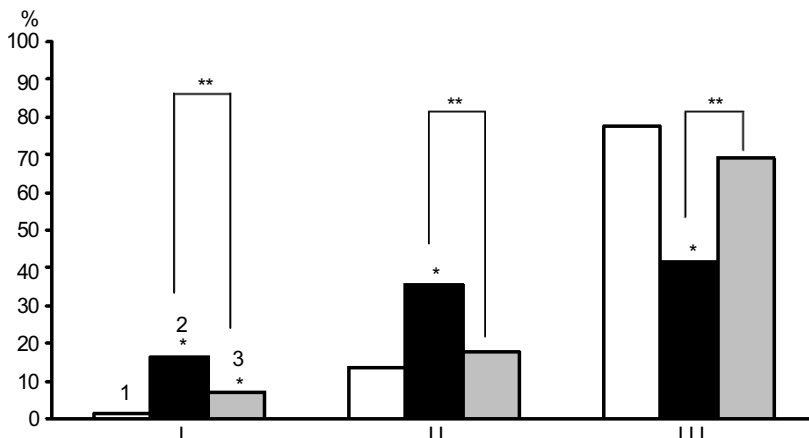


Рис. 1. Зміни відсотка (від загальної кількості лейкоцитів) паличкоядерних (I), сегментоядерних нейтрофілів (II) і лімфоцитів (III) крові мишей під впливом конканаваліну А (КонА) і протипечінкових антитіл (ППА): 1 – контроль, 2 – КонА, 3 – ППА. * $P < 0,01$ порівняно з контролем, ** $P < 0,01$ при порівнянні дії КонА і ППА

цитолітичний характер і супроводжувалося розвитком інтенсивнішого запального процесу, ніж ушкодження антитільного генезу.

При обробці препаратів моноклеарів печінки моноклональними антитілами ІПО-38 при обох видах ушкодження печінки виявлено наявність клітин, що експресували АПК. Світіння спостерігалось у вигляді смужки під ядерною оболонкою та гранул у нуклеоплазмі клітин або чітко виявлялося в ядерцях, що говорило про різні стадії клітинного циклу. В деяких клітинах ІПО-38-позитивний матеріал виявлявся мономорфно в нуклеоплазмі поряд з деякими ознаками порушення клітинної мембрани, що свідчило про некробіоз цих клітин. У макрофагоцитах і моноцитах переважно спостерігалось гранулярне світіння в нуклеоплазмі клітин. При введенні як КонА, так і ППА, майже однаково посилювалася проліферативна активність моноклеарів печінки. Встановлено збільшення відсотка ІПО-38-позитивних клітин в 2,26 і 2,47 рази при дії КонА і ППА відповідно (рис 2,а). Виявлено також суттєве збільшення середнього цитохімічного коефіцієнта, що характеризує вираженість експресії АПК (див. рис 2,б). У разі дії обох чинників реєструвалися ІПО-38 – позитивні клітини

на різних стадіях клітинного циклу.

Цитологічне дослідження популяції лімфоцитів, виділених з печінки, за морфологічними ознаками різних стадій клітинної диференціації дало змогу встановити суттєві відмінності в реакції печінки на КонА та ППА. Саме за умов дії ППА відбувався перерозподіл субпопуляцій клітин: зменшувався відсоток великих і збільшувався відсоток малих, більш високодиференційованих лімфоцитів (рис 3,а), це є ознакою активації імунних реакцій [5]. Також встановлено, що при введенні ППА збільшувався відсоток плазматичних клітин серед моноклеарів печінки (див. рис. 3,б), що свідчило про посилення активності гуморальної ланки імунних реакцій. У разі дії КонА не виявлено статистично вірогідного збільшення кількості плазматичних клітин і перерозподілу серед субпопуляцій лімфоцитів. Таким чином, при введенні ППА спостерігалася більш виражена порівняно з КонА активація імунних процесів у тканині печінки.

Відомо, що проліферативні процеси й активація імунокомпетентних клітин призводять до посилення клітинної загибелі. Це один з базових механізмів підтримання клітинного гомеостазу та обмеження

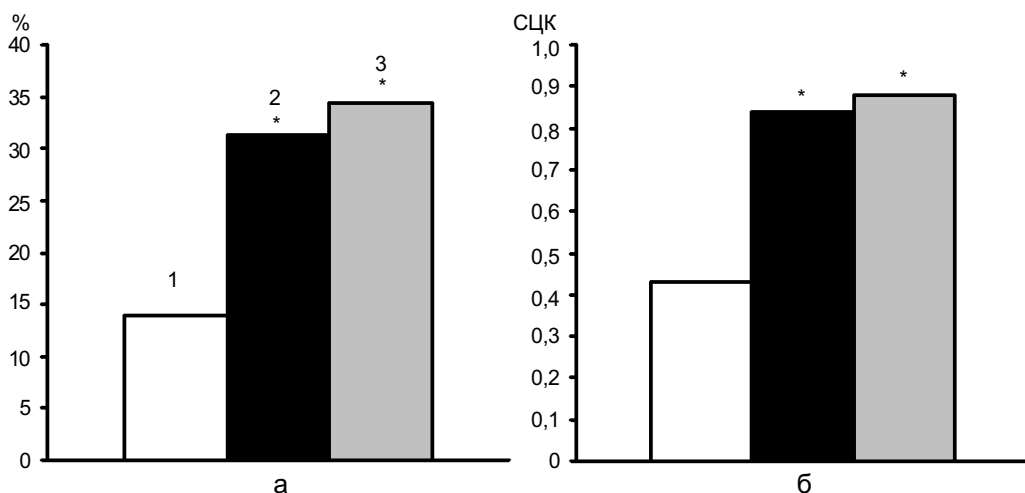


Рис. 2. Вплив конканаваліну А (КонА) і протипечінкових антитіл (ППА) на відсоток ІПО-38-позитивних моноклеарних клітин у печінці (а) і середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК) експресії антигена проліферуючих клітин (б): 1 – контроль, 2 – КонА, 3 – ППА. * P<0,001 відносно контролю

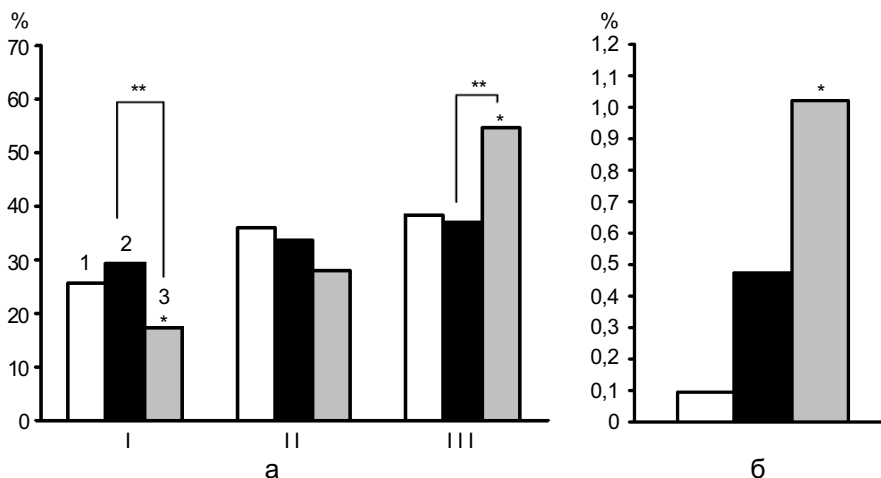


Рис. 3. Вплив конканаваліну А (КонА) і протипечінкових антитіл (ППА) на відсоток (від загальної кількості лімфоцитів печінки) великих (I), середніх (II) і малих лімфоцитів (III) (а) і плазматичних клітин (б) у мононуклеарних клітинах печінки: 1 – контроль, 2 – КонА, 3 – ППА. * $P < 0,05$ порівняно контролем, ** $P < 0,05$ при порівнянні дії КонА і ППА

надмірної активації імунних реакцій. Наші дослідження показали, що посилення проліферації за умов імунного ураження печінки як клітинного, так і антитільного генезу супроводжувалося посиленням клітинної загибелі, що проявлялося в зменшенні відсотка живих клітин (рис. 4,а). Обидва чинники імунного ураження збільшували апоптотичну загибель мононуклеарів печінки (див. рис.4,а), однак ці процеси були більш виражені за умов дії КонА, який посилював апоптоз в 1,9 раза, тоді як ППА – в 1,5 раза. Показано, що

введення КонА також суттєво підвищувало некроз цих клітин (див. рис.4,б). Цитологічне дослідження апоптотичних мононуклеарів печінки виявило збільшення відсотка клітин з ознаками вторинного постапоптотичного некрозу (з фрагментованими ядрами та порушеною плазматичною мембраною) за умов дії КонА з $0,25 \pm 0,17$ у контролі до $1,32 \pm 0,41\%$ ($P < 0,05$). При дії ППА не було виявлено статистично достовірних змін цього показника, який становив $0,74 \pm 0,13\%$. Відомо, що печінка є органом елімінації активованих $CD8^+$ -клітин, в

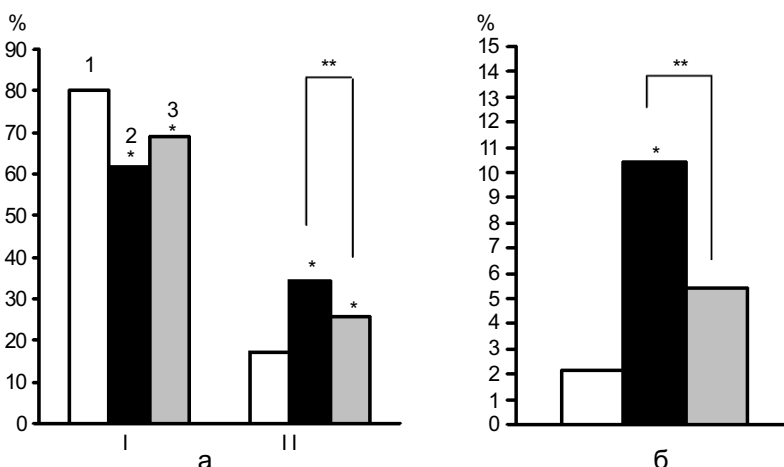


Рис. 4. Вплив конканаваліну А (КонА) і протипечінкових антитіл (ППА) на відсоток живих (I), апоптотичних (II) (а) і некротичних (б) мононуклеарних клітин, виділених з печінки мишей: 1 – контроль, 2 – КонА, 3 – ППА. * $P < 0,05$ порівняно з контролем, ** $P < 0,05$ при порівнянні дії КонА і ППА

яких ініціюються процеси апоптозу з наступним фагоцитозом Купферівськими та іншими клітинами [12,14]. Збільшення вторинного постапоптотичного некрозу лімфоцитів у печінці за патологічних умов може бути важливим механізмом запуску та посилення запальних процесів у цьому органі. Порівняння змін клітинної загибелі мононуклеарів печінки за умов її експериментального ураження клітинного й анти-тільного генезу показало, що введення КонА спричиняло більше посилення апоптозу та некрозу, ніж введення антитіл ($P < 0,05$ у порівнянні з ППА в обох випадках).

Дослідження з використанням моноклональних анти- Fas-антитіл встановило, що при експериментальному імунному ураженні обох типів збільшувався відсоток мононуклеарних клітин печінки, які експресували цей антиген, і підвищувався середній цитохімічний коефіцієнт його експресії (рис. 5), що було більш вираженим за умов дії КонА порівняно з ППА ($P < 0,05$). Fas являє собою рецептор, котрий при зв'язуванні з відповідним лігандом (який може бути розчинним або пов'язаним з мембранами клітин-ефекторів апоптозу) запускає процеси апоптотичної загибелі. Таким чином, важливим механізмом запуску клітинної загибелі за умов імунного ура-

ження печінки є Fas-опосередкований шлях індукції апоптозу, який більшою мірою активується при введенні КонА.

За сучасними уявленнями в основі багатьох аутоімунних захворювань лежить порушення гомеостатичних механізмів функціонування імунної системи. Одним з них є підтримання необхідного в цих умовах співвідношення проліферації та загибелі імунокомпетентних клітин. Перший етап розвитку захисних реакцій організму характеризується інтенсивною проліферацією клітин, які здійснюють як неспецифічний, так і антигенспецифічний захист. Завершення імунної відповіді потребує посиленої елімінації вже непотрібних активованих клітин-ефекторів запалення та імунної відповіді, що призводить до переважання клітинної загибелі над процесами клітинного поділу. В разі послаблення чи збоїв у регуляторних механізмах, що контролюють життєздатність і загибель імунокомпетентних клітин, виникає низка захворювань, у тому числі аутоімунних уражень органів. На моделі КонА-індукованого гепатиту ми показали, що при ураженні печінки Т-клітинного генезу, поряд з проліферацією та активацією мононуклеарних клітин печінки, значно посилюється клітинна загибель (апоптоз, а також

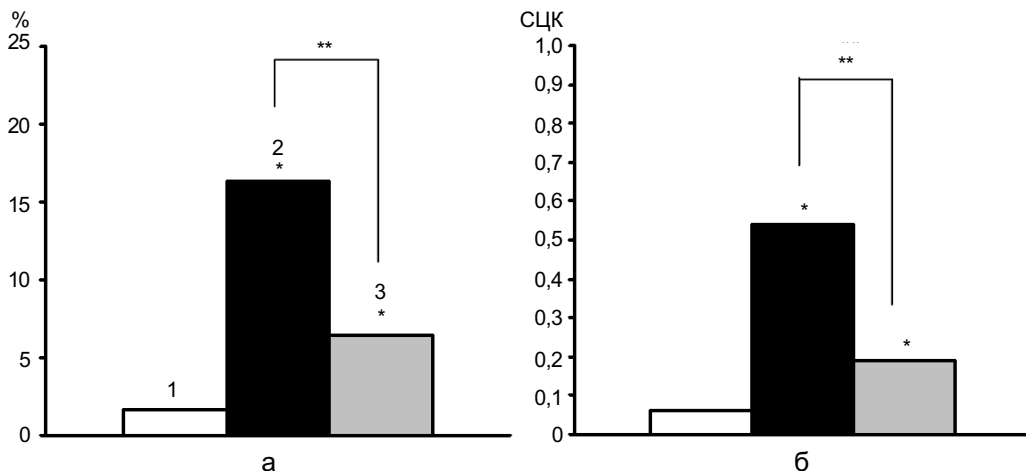


Рис. 5. Вплив конканаваліну А (КонА) і протипечінкових антитіл (ППА) на відсоток клітин, що експресують CD95 (а), і на середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК) експресії CD95 (б) у мононуклеарних клітинах, виділених з печінки мишей: 1 – контроль, 2 – КонА, 3 – ППА. * $P < 0,05$ порівняно з контролем, ** $P < 0,05$ при порівнянні дії КонА і ППА

первинний і вторинний некроз), що призводить до розвитку запалення та посилення ушкодження гепатоцитів. Моделювання ушкодження печінки за допомогою ППА дало змогу встановити, що в цьому разі проліферація превалює над процесами загибелі клітин. Таким чином, можна вважати, що участь антитіл в аутоімунних ушкодженнях печінки пов'язана здебільшого з активацією та проліферацією імунокомпетентних клітин, ніж з посиленням клітинної загибелі.

Одержані результати свідчать про те, що імунне ураження печінки Т-клітинного й антитільного генезу мало як спільні, так і відмінні риси щодо проліферації і загибелі імунокомпетентних клітин у цьому органі. В обох випадках посилення проліферації цих клітин було майже однаковим. Однак саме під впливом антитіл відзначався істотніший розвиток імунних реакцій у печінці, що виражалось у збільшенні кількості плазматичних клітин і високодиференційованих малих лімфоцитів. Апоптоз імунокомпетентних клітин, як механізм підтримання клітинного гомеостазу й обмеження надмірної активації імунних реакцій, спостерігався при обох видах імунного ураження печінки. Проте при ураженні Т-клітинного генезу клітинна загибель була значнішою, про що свідчить посилення апоптозу, некрозу і експресії Fas-рецептора на мононуклеарах печінки, більше, ніж при дії антитіл. Значне посилення як первинного, так і вторинного некрозу за умов КонА-індукованого гепатиту може бути важливим механізмом розвитку запалення при експериментальному гепатиті Т-клітинного генезу.

**N.V. Makogon, S.I. Pavlovich, T.M. Bryzgina,
L.I. Alexyuk, V.S. Sukhina, N.G. Grushka, I.M.
Alexeyeva**

CELL PROLIFERATION AND DEATH OF LIVER MONONUCLEAR CELLS IN IMMUNE HEPATITIS INDUCED BY CONCAVALIN A AND ANTI-LIVER ANTIBODIES IN MICE

Two types of experimental liver failure in mice were investigated to study the immune mechanisms of liver disease: 1) T-cell-

mediated injury induced by administration of concanavalin A (ConA) and 2) antibody-mediated injury induced by administration of anti-liver antibodies (ALA, γ -globulin fraction of sera from rabbits immunized with liver tissue). It was established, that both types of liver injury were accompanied by the activation of immune processes in the liver, as shown by the increase of liver mononuclear cell proliferation, estimated using IPO-38 monoclonal antibodies. In contrast to ConA treatment, the immune activation under ALA-treatment was also associated with the increase in the percentage of plasma cells and small lymphocytes in liver mononuclear cells. At the same time, an increase in apoptotic and necrotic mononuclear cell death was more pronounced under ConA-treatment. This was accompanied by enhanced Fas receptor expression in these cells. Thus, it was shown that in case of T-cell mediated liver injury, the balance between cell proliferation and cell death in mononuclear liver cells was shifted toward the significant increase of apoptotic and necrotic cell death, particularly Fas-mediated apoptosis, while immune processes activation and cell proliferation were more pronounced in the case of antibodies-mediated injury.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Иммунологические методы/Под ред. Г.Фримеля. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
2. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – 912 с.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. школа, 1980. – 293 с.
4. Міхалап С. В. Нові моноклональні антитіла IPO-38 до ядерного антигену, що асоційований з проліферацією нормальних та злоякіснотрансформованих клітин: Автореф. дис... канд. біол. наук. – К., 1998. – 18 с.
5. Труфакин В.А. Иммуноморфологические аспекты аутоиммунных процессов. – Новосибирск: Наука, 1983. – 178 с.
6. Astaldi G., Verga L. Experimental investigations on the influence of x-rays on glycogen content in surviving leucocytes// *Experientia*. – 1957. – **13**, №6. – P.244–245.
7. Czaja A.J. Current concepts in autoimmune hepatitis// *Ann. Hepatol.* – 2005. – **4**, №1. – P.6–24.
8. Dong Z.J., Wei H.M., Sun R. et al. Isolation of murine hepatic lymphocytes using mechanical dissection for phenotypic and functional analysis of NK1.1+ cells // *World J. Gastroenterol.* – 2004. – **10**, №13. – P.1928–1933.
9. Jones D.E., Palmer J.M., Bennet K. et al. Investigation of a mechanism for accelerated breakdown of immune tolerance to the primary biliary cirrhosis-associated autoantigen, pyruvate dehydrogenase complex // *Lab. Invest.* – 2002. – **82**, №2. – P.209–211.
10. Lapiere P., Djilali-Saiah I., Vitozzi S., Alvarez F. A murine model of type 2 autoimmune hepatitis: Xenoinmunisation with human antigens // *Hepatology*. – 2004. – **39**, №4. – P.1066–1074.
11. Lowry O., Boserbrough N.I., Farr A.L., Randal R.I.

- Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, №1. – P.265–273.
12. Mackay I.R. Hepatoimmunology: a perspective // Immunol. Cell Biol. – 2002. – 80, №1. – P.36–44.
 13. Mikhalap S.V., Shlapatska L.M., Berdova A.G. et al. Monoclonal antibody IPO-38 in evaluation of proliferative activity of tumor cells // Exp. Oncology. – 2000. – **22**, №2. – P.36–38.
 14. Racanelly V., Rehermann B. The liver as an immunological organ // Hepatology. – 2006. – **43**, №2. – P.S54–S62.
 15. Shimizu S., Eguchi Y., Kamiike W. et al. Involvement of ICE family proteases in apoptosis induced by reoxygenation of hypoxic hepatocytes // Amer. J.Physiol. – 1996. – **271**, № 6. – P. 949–958.
 16. Tiegs G., Hentschel J., Wendel A. A T-cell dependent Experimental liver Injury in mice inducible by concanavalin A // J.Clin.Invest. – 1992. – **90**, July. – P. 196–203.
 17. Tiegs G. Cellular and cytokine-mediated mechanisms of inflammation and its modulation in immune-mediated liver injury // Z.Gastroenterol. – 2007. – **45**, № 1. – P. 63–70.
 18. Washington M.K. Autoimmune liver disease: overlap and outliers // Modern Pathol. – 2007. – **20**, № 6. – P. S15–S30.
 19. Yamauchi K., Yamaguchi N, Furukawa T. et al. A murine model of acute liver injury induced by human monoclonal autoantibody // Hepatology. – 2005. – **42**(1), July. – P. 149–155.
 20. Yoshida Y., Myozaki M., Kuroda E., Yamashita U. Cytotoxic effect of an anti-liver monoclonal autoantibody obtained after neonatal thymectomy in mice // J. Autoimmun. – 2001. – **16**, №4. – P.373–382.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
Imm@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до
редакції 11.03.2008*