

И. Т. МИАНСАРЯН, Э. Р. ПАШИНЯН

РЕАКЦИЯ БЛАСТТРАНСФОРМАЦИИ В СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЕ ЛЕЙКОЦИТОВ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

Прогресс хирургической техники, позволивший трансплантировать органы и ткани, вызвал настоятельную потребность в методах, определяющих тканевую совместимость между отдельными индивидуумами. К этим методам предъявляется целый ряд требований: проба должна быть как методом подбора, так и исключения предполагаемого донора, не должна сенсibilизировать будущего реципиента, должна быть быстрой и давать высокую степень различия. Иммунная ответная реакция может быть определена при обнаружении ряда гуморальных факторов, однако они появляются лишь после трансплантации и, естественно, не могут заранее предсказать реакцию на трансплантат от данного донора.

Многочисленные исследования обнаружили и подтвердили важную роль лимфоцитов в отторжении гомотрансплантата и поэтому вполне закономерны попытки использовать лимфоциты периферической крови как донора, так и реципиента трансплантата для определения степени тканевой совместимости.

В литературе описан [6, 10] метод переноса лимфоцитов и показано, что реакция кожи донора на внутрикожное введение лимфоцитов реципиента коррелирует со временем переживания кожного трансплантата. Однако этот метод имеет ряд недостатков, в частности, он применяется *in vivo* и может привести к сенсibilизации донора. Кроме того, хотя реакция и представляет собой в основном воспалительную реакцию замедленного типа, в ней могут принять участие и неспецифические моменты, не связанные с иммунными факторами.

Исследования культуры лимфоцитов периферической крови, стимулированных *in vitro* неспецифическими (ФГА) и специфическими (для данного донора лейкоцитов) антигенами, показали, что сенсibilизированные лимфоциты дают выраженную бласттрансформацию в ответ на соответствующий антиген, продуцируют γ -глобулин, возможно, в форме специфических антител [3, 9].

Эта способность культуры лимфоцитов реагировать на антигенный стимул послужила предпосылкой для изучения смешанной культуры лимфоцитов, поскольку известно, что лейкоциты являются источником трансплантационных антигенов.

Ряд авторов [5, 11 и др.] показали, что при смешивании

лейкоцитов периферической крови двух генетически не родственных людей стимулируется пролиферация клеток, подтверждаемая как морфологическими исследованиями (появление бластоподобных клеток и фигур митоза), так и ауторадиографически—при обработке культуры меченными предшественниками ДНК. Подобная трансформация наблюдалась в значительно меньшей степени при смешивании лейкоцитов генетически связанных людей [4] и не наблюдалась в смешанной культуре лейкоцитов однойцевых близнецов [2, 8].

Полученные результаты, подтвержденные в дальнейшем исследованиями ряда авторов, дали основание предположить, что смешанная культура лейкоцитов—возможный тест для определения *in vitro* степени тканевой совместимости между предполагаемым донором и реципиентом гомотрансплантата.

В настоящей работе приводятся результаты исследования 118 смешанных культур лейкоцитов. Одновременно в 42 случаях изучены контрольные культуры клеток соответствующих доноров, культивированных изолированно в равных условиях.

Методика. В стерильный гепаринизированный шприц путем венопункции набирали 10—12 мл крови. Кровь отстаивали в стерильной пробирке при комнатной температуре в течение 1—1,5 часов. Надосадочный слой плазмы, богатый лейкоцитами, осторожно переносили в другую стерильную пробирку, определяли количество клеток в 1 мл взвеси и готовили мазок для подсчета лейкоформулы. Взвесь лейкоцитов разводили средней 199 до концентрации 2×10^6 клеток. По 1 мл клеточной суспензии от каждого 2 доноров переносили в стерильный пенициллиновый флакон, на дно которого предварительно помещали 1/4 покровного стекла. Затем вдували 5% CO_2 и флаконы плотно закрывали стерильными резиновыми пробками. Инкубировали в термостате при 37°. Смесь лейкоцитов каждой пары доноров дублировалась. Культивировали 72 и 144 часа. Затем флаконы извлекали из термостата, культуральную жидкость осторожно сливали, извлекали покровные стекла, высушивали их на воздухе, фиксировали метиловым спиртом и окрашивали азури-эозином. Затем стекла промывали дистиллированной водой, сушили и укрепляли канадским бальзамом на предметных стеклах; микроскопировали с иммерсией.

В большинстве препаратов подсчитано 500—1000 клеток и определено процентное содержание различных типов клеток в каждом препарате.

В ряде случаев в культуральную среду добавляли антибиотики (пенициллин и стрептомицин), однако необходимо отметить, что ни в одном случае культивирования без антибиотиков мы не наблюдали (контаминант) бактериального загрязнения.

Как видно из табл. 1, в среднем более 50% всех элементов клеточной суспензии до начала культивирования составляли лимфоциты.

Изучение контрольных монокультур в те же сроки культивирования показало выраженную направленность трансформации в сторону макрофагов.

На 3-и сутки количество клеток, переходных к макрофагам, и макрофагов составляло $6,04 \pm 1,11$ и $11,99 \pm 2,72\%$, а к 6-м доходило до $6,94 \pm 1,10$ и $30,58 \pm 4,90\%$. В то же время бласттрансформация была незначительной. Содержание переходных к бластам на 3-и сутки было всего $0,64 \pm 0,18$, на 6-е— $0,65 \pm 0,20\%$, а бластных клеток в те же сроки $0,14 \pm 0,13$ и $0,21 \pm 0,06\%$. Митозы наблюдались лишь в единичных

Таблица 1
Морфологический состав клеточной суспензии

Тип клеток	$M \pm m$	Пределы колебаний
Палочкоядерные нейтрофилы	$2,4 \pm 0,24$	0,5—7,5
Сегментоядерные нейтрофилы	$38,5 \pm 1,62$	10,5—82,0
Эозинофилы	$1,8 \pm 0,31$	0,5—16,5
Базофилы	$0,1 \pm 0,02$	0,5—1,0
Моноциты	$3,1 \pm 0,28$	0,5—12,5
Лимфоциты	$54,5 \pm 4,22$	3,5—85,5

препаратах. В небольшом проценте отмечались фибробласты и ретикулярные клетки, причем к 6-м суткам количество их, хотя и оставалось незначительным, однако статистически достоверно увеличивалось, по сравнению с 3-ми сутками.

Совершенно иная картина выявлена при изучении морфологического состава смешанных культур.

Прежде всего, необходимо отметить, что из 118 культур в 16 на 3-ьи сутки культивирования и в 11 на 6-е клеточный состав был крайне скудным, и с достоверностью исследовать морфологию клеток и определить их процентное содержание было невозможно. Существенным отличием смешанной культуры от несмешанной было выявляемое уже при обзоре малым увеличением значительное количество агломератов, состоящих в основном из малых лимфоцитов, переходных к бластам, и бластов, иногда содержащих клетки и в митозе (рис. 1).

Поскольку максимальное количество бласттрансформированных клеток в монокультуре составляло 6% (в одной культуре), мы считали целесообразным смешанные культуры с меньшим содержанием бластов рассматривать как отрицательные. При такой оценке положительными оказались на 3-ьи сутки 46 культур (45%), на 6-е сутки—69 (64,5%). Если же дифференцировать [8] положительные культуры по степени (до 12% и более), то окажется, что на 3-ьи сутки 21 культура может быть отнесена к I категории (6,1—12,0%), а 25—ко II (более 12,1%). На 6-е сутки к I категории относились лишь 14 культур, а ко II—55. Эти данные, подтвержденные статистическим анализом (табл. 2), указывают на значительное увеличение количества бласттрансформированных клеток через 144 часа культивирования.

В 98 препаратах из 102 на 3-ьи сутки и в 106 из 107 на 6-е сутки наблюдались лимфоциты, переходные к макрофагам, и макрофаги (рис. 2), причем отмечался довольно широкий диапазон колебаний их содержания в отдельных препаратах (до 44,8% через 72 часа и до 70,8% через 144 часа). В ряде случаев можно было проследить взаимосвязь



Рис. 1. Агломерат из малых лимфоцитов, переходных в бласты, и бластных клеток. В центре—фигура митоза.

между содержанием макрофагов в культуре и нейтрофилов в первоначальной клеточной суспензии. В цитоплазме многих макрофагов обнаружены обломки нейтрофилов. Возможно, что действительно транс-

Таблица 2

Морфологический состав смешанной культуры лейкоцитов на III и VI сутки культивирования

Тип клеток	Пределы колебаний	3-ьи сутки			Пределы колебаний	6-е сутки		
		X	M ₁	m ₁		X	M ₂	m ₂
Малые лимфоциты	0—99,4	101	70,73	2,21	8,0—98,7	107	64,84	2,37
Переходные к бластам	0,2—71,0	90	6,84	0,84	0,1—80,2	96	11,36	1,23
Бласты	0,3—56,2	60	2,75	0,78	0,2—33,2	76	5,38	0,7
Переходные к макрофагам	0,1—27,5	43	5,52	0,53	0,2—36,5	98	5,66	0,81
Макрофаги	0,1—44,8	93	8,43	0,9	0,2—70,8	94	9,99	1,23
Эозинофилы	0,2—5,6	66	1,04	0,1	0,1—8,5	63	0,86	0,12
Сегментоядерные нейтрофилы	0,2—46,0	50	4,35	0,8	0,2—18,2	37	1,03	0,28
Ретикулярные клетки	0,2—4,5	13	0,18	0,05	0,2—8,0	19	0,36	0,11
Фибробласты	0,1—4,0	4	0,06	0,03	0,4—3,0	4	0,05	0,03
Митозы	0,1—5,0	6	0,09	0,04	0,4—23,0	6	0,24	0,21

X—количество культур, в которых наблюдались указанный тип клеток.



Рис. 2. Скопление макрофагов.

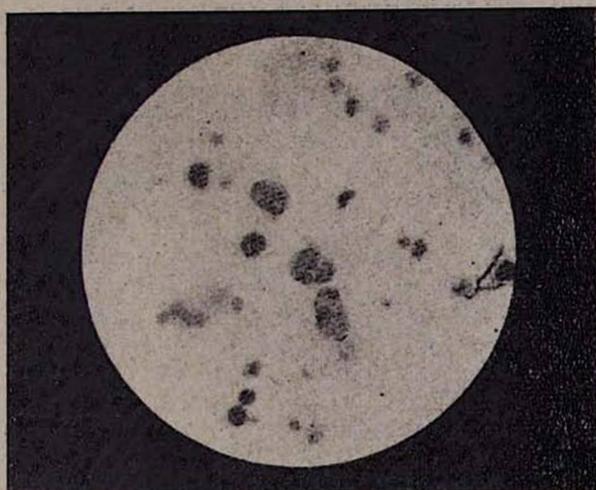


Рис. 3. Ретикулярные клетки и малые лимфоциты.

формация лимфоцитов в макрофаги связана с наличием в культуре нейтрофильных лейкоцитов [7].

Более чем в половине препаратов на 3-ьи и на 6-е сутки культивирования обнаруживались морфологически не измененные эозинофильные лейкоциты.

Ретикулярные клетки выявлены в 13 препаратах через 3 суток и в 19—через 6 суток (рис. 3), причем в среднем содержание их статистически достоверно увеличилось (табл. 2). Фибробласты, в крайне незначительном количестве, отмечены лишь в 4 препаратах.

Различные стадии деления клеток (рис. 4 и 5) обнаружены лишь в нескольких культурах, однако содержание их значительно колебалось и достигало 23% в одной культуре через 144 часа культивирования.

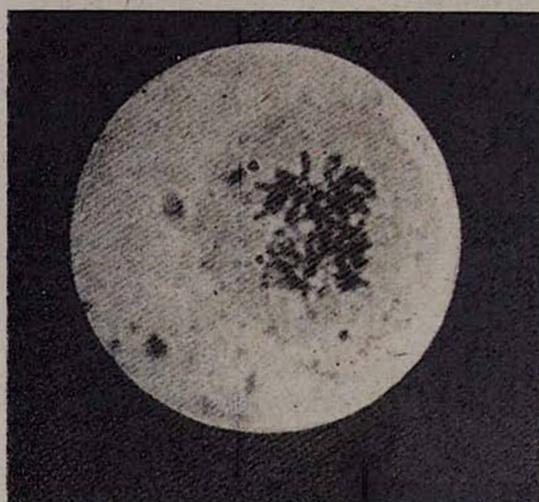
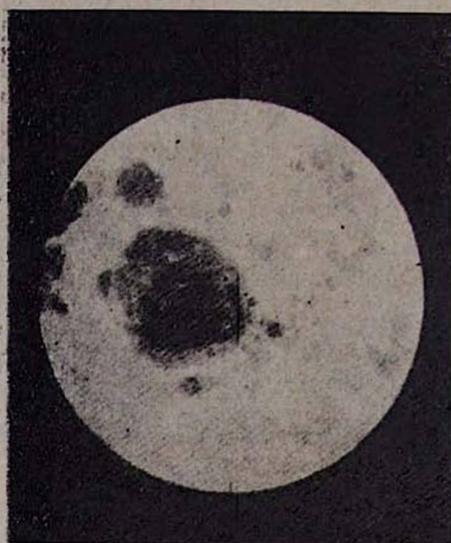


Рис. 4 и 5. Различные стадии митотического деления лимфоцитов.

Полученные нами данные указывают, что в смешанной культуре лейкоцитов отчетливо наблюдается появление blastopodобных форм клеток, причем содержание последних через 144 часа культивирования достоверно отличается от такового через 72 часа.

Большое число макрофагов в препаратах обоих сроков культивиро-

аввания может быть отчасти обусловлено наличием в первоначальной клеточной суспензии нейтрофильных лейкоцитов.

Таким образом, наши исследования подтверждают данные ряда авторов [8, 12] о довольно большом проценте отрицательных результатов в смешанной культуре лейкоцитов генетически не связанных доноров, что не согласуется с известной высокой частотой отторжения гомотрансплантата и результатами пробы переноса лимфоцитов. С другой стороны, значительный полиморфизм и широкий диапазон колебаний в процентном содержании отдельных типов клеток в культурах при одинаковых условиях культивирования, зависящие, по-видимому, от различного содержания в исходной клеточной популяции полиморфноядерных нейтрофилов, затрудняют стандартизацию и оценку получаемых результатов.

Указанные моменты дают нам основание высказаться с осторожностью о достаточной доказательности результатов смешанной культуры лейкоцитов в описанной модификации для определения *in vitro* степени тканевой совместимости. Мы полагаем, что этот тест должен применяться в сочетании с другими методами.

Ин-т кардиологии
и сердечной хирургии
МЗ Арм. ССР

Поступило 24.IX 1969 г.

Ի. Տ. ՄԻԱՆՍԱՐԻԱՆ, Է. Ռ. ՓԱՇԻՆԻԱՆ

ԲՂԱՍՏՏՐԱՆՏՖՈՐՄԱՑԻԱՅԻ ՌԵԱԿՑԻԱՆ ԱՌՈՂՋ ԴՈՆՈՐՆԵՐԻ ԼԵՅԿՈՑԻՏՆԵՐԻ
ԽԱՌԸ ԿՈՒԼՏՈՒՐԱՑՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Բերվում են առողջ դոնորների լեյկոցիտների 118 խառը կուլտուրաների հետազոտության արդյունքները: Հայտնաբերվել է տրանսֆորմացիայի պարզորոշ կերպով արտահայտված տարածություն դեպի բլաստանման ձև ունեցող բջիջների հայտնվելու կողմը, որը հատկապես աճ է տալիս կուլտիվացման 6 օրը:

I. T. MIANSARIAN, E. R. PASHINIAN

BLASTTRANSFORMATION REACTION IN MIXED CULTURES OF
LEUCOCYTES FROM HEALTHY DONORS

S u m m a r y

The results of investigation of 118 mixed cultures of leucocytes from healthy donors are presented. A marked trend of transformation toward development of blast-like forms of cells is revealed, increasing on the sixth day of cultivation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брауде Н. И. Успехи современной биологии. 1969, 67, 3, 432—451.
2. Гольдман И. Л. Генетика, 1966, 12, 85—94.
3. Bach F., Hirschhorn K. Exp. Cell. Res., 1963, 32, 592—595.
4. Bain B., Lowenstein L. Sci., 1964, 145, 13—15.
5. Bain B., Vas. M., Lowenstein L. Fed. Proc., 1963, 22, 428.
6. Brent L., Medawar P. W. Brit. Med. J., 1963, 2, 269—272.
7. Elves M., Gough J., Israels M. Exp. Cell. Res., 1966, 44, 624—627.
8. Elves M., Israels M. Lancet, 1965, 1, 1184—1186.
9. Elves M., Roath S., Taylor G., Israels M. Lancet, 1963, 1, 1292—1293.
10. Gray J., Russel P. Lancet, 1963, 2, 863—865.
11. Hirschhorn K., Bach F., Kolodny R., Fischein I., Hashem N. Sci., 1963, 142, 1185—1187.
12. Ricci M., Passaleva A., Rieca M. Lancet, 1966, 2, 503.