

УДК 612.112+616—097+616.155.32

И. Т. МИАНСАРЯН, Э. Р. ПАШИНЯН

ОСОБЕННОСТИ ТРАНСФОРМАЦИИ IN VITRO ЛИМФОЦИТОВ
В ОТСУТСТВИИ АНТИГЕННОГО СТИМУЛЯТОРА

Несмотря на довольно обширную литературу, многочисленные экспериментальные исследования и клинические наблюдения, истинное значение лимфоцитов в организме до настоящего времени не может считаться выясненным. Достаточно убедительно показано участие лимфоцитов в определенных воспалительных и иммунологических процессах, но специфическая роль этих клеток в нормальных и патологических условиях продолжает оставаться предметом оживленных дискуссий. Нет единства мнений даже в вопросе о том, являются ли лимфоциты периферической крови зрелыми клетками с определенными функциями, или они представляют собой потенциальные стволовые клетки и при известных условиях могут дать начало всем остальным форменным элементам крови как миелоидного, так и эритроидного ряда. В пользу последнего мнения свидетельствуют некоторые экспериментальные исследования, в частности *in vitro*, убедительно показавшие способность лимфоцитов к пролиферации и трансформации.

Для изучения иммунологической активности лимфоцитов в последние годы широкое применение получила культура ткани лимфоцитов, стимулированных тем или иным антигеном. Было показано, что как неспецифические (фитогемагглютинин), так и специфические (для данного донора лимфоцитов) антигены вызывают в культуре отчетливую трансформацию лимфоцитов в бластоподобные клетки, активируют синтез РНК и ДНК и приводят к антителообразованию *in vitro*. В качестве специфических антигенов были использованы различными авторами туберкулин, дифтерийный и столбнячный анатоксины, вакцины против оспы, коклюша, кори, пенициллин и другие, вызывающие бластотрансформацию у 5—45% клеток с максимумом на 5—7-й день культивирования [2, 7, 8, 12, 13, 16, 19, 21]. Было установлено также, что культивирование в одном флаконе лимфоцитов от двух генетически различных лиц приводит к появлению бластных клеток, морфологически идентичных клеткам, возникающим *in vitro* в культурах, стимулированных фитогемагглютинином, и базофильным клеткам, обнаруживаемым в тканях, активно синтезирующих антитела *in vivo* [4, 10]. Существует пред-

положение о ценности этого метода для определения *in vitro* степени тканевой совместимости между реципиентом и донором.

Проводя исследования по изучению смешанной культуры лейкоцитов, мы считали целесообразным одновременно изучить направленность трансформации лимфоцитов в монокультуре лейкоцитов тех же доноров. В настоящей работе приводятся результаты изучения несмешанных культур лейкоцитов 42 здоровых доноров.

Лейкоциты культивировали по модифицированной методике Хангерфорд с соавторами [17]. В стерильную гепаринизированную пробирку набирали 10—12 мл венозной крови и отстаивали ее при комнатной температуре под углом 45° в течении 60—90 минут. Надосадочный слой плазмы, содержащий взвесь лейкоцитов, осторожно отсасывали и переносили в стерильную пробирку. Определяли количество лейкоцитов в 1 мл взвеси и готовили мазок для определения лейкоформулы. Лейкоцитарную взвесь разводили в среде 199 до концентрации 2×10^6 клеток в 1 мл. По 2 мл взвеси лейкоцитов в среде 199 переносили в стерильные пенициллиновые флаконы, на дно которых предварительно помещали $\frac{1}{4}$ покровного стекла. Во флаконы вдували 5% CO_2 (остаточный воздух из легких). Флаконы плотно закрывались стерильными пробками и помещались в термостат при 37° . На 3 и 6-е сутки покровные стекла осторожно извлекались из флаконов, высушивались на воздухе, фиксировались метиловым спиртом и окрашивались по Романовскому. После высушивания покровные стекла с помощью канадского бальзама монтировались на предметных стеклах и микроскопировались с иммерсией.

При изучении лейкоформулы в мазках до культивирования (подсчет 200 клеток) оказалось, что преобладающим типом клеток в клеточной суспензии до начала культивирования были лимфоциты (в среднем 55,3%). Сегментоядерные нейтрофилы составляли 37,3%, палочкоядерные—2,4%, моноциты—3,2%, эозинофилы—1,7% и базофилы—около 0,1%.

В подавляющем большинстве препаратов, полученных в результате культивирования, подсчитано 500—1000 клеток и лишь в единичных, в связи с малым количеством их,—200—300 клеток. Морфологический состав клеточной популяции в культурах на 3-и и 6-е сутки культивирования представлен в табл. 1.

Как видно из табл. 1, через 72 ч. преобладающим типом клеток в культуре были малые лимфоциты, однако диапазон колебаний их содержания в отдельных культурах был очень широк (15,6—100%). Морфологически в большинстве препаратов они были сходны с обычно наблюдаемыми лимфоцитами в мазках периферической крови, хотя в некоторых культурах ядра малых лимфоцитов были разрыхлены и иногда оставляли впечатление предстадии митоза. В двух культурах этого срока культивирования отмечены агломераты из малых лимфоцитов и бластов. В среднем количество бластотрансформированных (переходные в бласты и бласты) лимфоцитов было невелико и составляло менее 1% (с колебаниями от 0,2 до 6,0% в одной культуре). Напротив, отме-

Таблица 1

Морфологический состав клеток в культуре периферической крови человека
(без антигенного стимулятора)

Клетки	3-и сутки			6-е сутки			
	предел колебаний	M ₁	m ₁	предел колебаний	M ₂	m ₂	P
Малые лимфоциты . . .	15,6—100,0	75,87	3,38	1,5—95,8	56,67	5,28	<0,01
Переходные в бласты . .	0,1—6,0	0,64	0,18	0,2—3,8	0,65	0,20	>0,3
Бласты	1,0—2,3	0,14	0,13	0,1—1,5	0,21	0,06	<0,3
Переходные в макрофаги	0,2—46,0	6,04	1,11	0,2—20,0	6,94	1,10	>0,3
Макрофаги	0,3—66,0	11,99	2,72	0,6—90,6	30,58	4,90	<0,01
Эозинофилы	0,2—28,0	1,53	0,68	0,4—38,2	2,04	1,05	>0,3
Сегментоядерные	0,2—12,8	0,96	0,35	0,1—1,0	0,05	0,03	<0,02
Ретикулярные	0,1—1,0	0,07	0,03	0,1—4,0	0,34	0,14	<0,05
Фибробласты	0,4—0,8	0,03	0,02	1,0—18,0	2,12	0,72	<0,01
Полибласты	—	—	—	1,2—8,5	0,39	0,24	—
Митозы	0,4—1,0	0,03	0,02	0,4—0,4	0,01	0,01	>0,3

чалась отчетливо выраженная направленность трансформации в сторону перехода в макрофаги (в среднем переходные в макрофаги и макрофаги составляли 18% с колебаниями в отдельных культурах от 3,4 до 83,8%). Морфологически макрофаги характеризовались большими размерами клетки с нечеткими неправильной формы контурами, бледно-голубой вакуолизированной цитоплазмой и большим рыхлым, иногда сетчатым ядром (рис. 1). В нескольких препаратах отмечались скопления



Рис. 1. Макрофаги и малые лимфоциты в монокультуре без антигенного стимулятора.

Рис. 2. Митоз в монокультуре через 72 ч. культивирования.

макрофагов—агломераты. Сегментоядерные нейтрофилы обнаружены лишь в трети препаратов (в 14 из 42) и большей частью с признаками дегенерации (фрагментация и пикнотизация ядер, значительное уменьшение грануляции, иногда гомогенизация цитоплазмы). Эозинофилы же хорошо сохранялись в культуре и морфологически выглядели неизменными. Уже через 72 ч. в пяти культурах обнаружены единичные ретикулярные клетки, а в 2—фибробласты. В двух препаратах выявлены митозы (рис. 2).

На 6-е сутки культивирования отмечено статистически достоверное снижение числа малых лимфоцитов до 56,67% и нарастание количества переходных в макрофаги и макрофагов в среднем до 37,52% (в отдельных культурах содержание последних достигало 96,6%). Содержание бласттрансформированных элементов существенно не изменилось. Сегментоядерные нейтрофилы выявлены лишь в 5 препаратах, и среднее их число статистически достоверно отличалось от такового в трехсуточных культурах. Одновременно отмечалось значительное статистически достоверное нарастание числа ретикулярных клеток и фибробластов. В четырех культурах отмечено появление гигантских многоядерных клеток с пенистой, иногда вакуолизированной цитоплазмой (полибласты).

Таким образом, полученные нами данные указывают, что в культуре лейкоцитов одного донора без митогенного стимулятора имеет место трансформация лимфоцитов не в бластоподобные клетки, а в основном в макрофаги. Эти результаты согласуются с данными ряда авторов [3, 18, 20], обнаруживших в культуре лейкоцитов от одного донора макрофаги и связывающих их появление с малыми лимфоцитами. Трудно согласиться с мнением о моноцитарном в основном происхождении макрофагов [18]. Хотя имеются указания на пролиферацию и деление моноцитов в культуре, они не могут обеспечить столь быстрое нарастание содержания макрофагов к 72 ч. С другой стороны, как исследования, основанные на чисто морфологических данных [5], так и данные Гоут и соавторов [14], использовавших метку H^3 -тимидином малых лимфоцитов, с несомненностью доказывают связь макрофагов в культуре именно с лимфоцитами. Однако Элвс [9] считает, что для трансформации лимфоцитов в макрофаги необходимо, по-видимому, присутствие жизнеспособных нейтрофилов, так как добавление последних к культуре чистых лимфоцитов повышает степень трансформации в макрофаги. Подобного влияния не оказывает добавление гомогенизированных или убитых нагреванием нейтрофилов. Он склонен связывать трансформацию лимфоцитов в макрофаги *in vitro* с фагоцитарной активностью нейтрофилов [11].

Нам не удалось выявить строгого параллелизма между содержанием макрофагов в культуре и количеством нейтрофилов в клеточной суспензии до начала культивирования. Возможно, имеет место не количественная, а качественная взаимосвязь между нейтрофилами и направленностью трансформации лимфоцитов в культуре периферической крови.

Истинные механизмы, приводящие к трансформации лимфоцитов в макрофаги и в небольшом проценте в бластоподобные клетки, ретикулярные и фибробласты в культуре клеток одного донора при отсутствии антигенного стимулятора, остаются пока неясными. Были высказаны предположения о наличии в сыворотке (в частности, в смешанной АВ сыворотке) факторов, стимулирующих трансформацию лимфоцитов [6]. Хашем [15], обсуждая данные Сабесин [22] о выраженной спонтанной бластоидной трансформации, приводит собственные наблюдения по

сравнению результатов культивирования лейкоцитов в аутологичной плазме, гомологичной плазме и в синтетической среде Игла (с добавлением 20%-ной бычьей сыворотки) и приходит к заключению о наличии в плазме специфических субстанций, способствующих осуществлению специализированной функции лимфоцитов и тормозящей их митотическую активность. Возможно, именно поэтому использование метода Сабесина [22], включающего повторное, до культивирования, отмывание клеток в среде Игла и удаление таким образом аутологичной плазмы, приводило к столь высоким показателям бласттрансформации лимфоцитов.

Приведенные литературные данные и наши наблюдения подтверждают предположения о широких потенциальных возможностях малого лимфоцита периферической крови, в частности *in vitro*, в зависимости от условий культивирования.

Ереванский институт гематологии
и переливания крови

Поступило 20/IX 1969 г.

Ի. Տ. ՄԻԱՆՍԱՐՅԱՆ, Է. Ռ. ՓԱՇԻՆՅԱՆ

ԼԻՄՖՈՑԻՏՆԵՐԻ IN VITRO ՏՐԱՆՏՈՐՄԱՑԻԱՅԻ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆ- ՆԵՐԸ ԱՆՏԻԳԵՆԱՅԻՆ ՍՏԻՄՈՒԼՅԱՏՈՐԻ ԲԱՑԱԿԱՅՈՒԹՅԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հոգվածում ամփոփվում են առողջ դոնորներից վերցրած 42 մոնոկլոնալ-
րանների ուսումնասիրության արդյունքները 72 և 144 ժամ կուլտիվացիայից
հետո՝ առանց անտիգենային ստիմուլյատորի: Հիմնականում լիմֆոցիտները
տրանսֆորմացիայի են ենթարկվում մակրոֆագներին:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Брауде Н. И., Гриншпун Л. Д., Крючков М. Н. Вестник АМН СССР, 1968, 4, стр. 65.
2. Bach F., Hirschhorn K. Exp. Cell. Res., 1963, 32, 3, 592.
3. Bach F., Hirschhorn K. Sci., 1964, 143, 3608, 813.
4. Bain B., Vas M., Lowenstein L. Fed. Proc., 1963, 32, 2, 428.
5. Berman L., Stulberg C. Lab. Invest., 1962, 11, 12, 1322.
6. Bishun N. J. Med. Genet., 1967, 4, 1, 41.
7. Cooper H., Rubin A. Lancet, 1965, 2, 7415, 723.
8. Cowling D., Quaglino D. J. Pat. Bact., 1965, 89, 1, 63.
9. Elves M. Curr. Res. in Leucaemia, Cambridge, 1965, 165.
10. Elves M., Israels M. Lancet, 1965, 1, 7397, 1184.
11. Elves M., Gough J., Israels M. Exp. Cell. Res., 1966, 44, 2—3, 624.
12. Florio L., Weiss G., Lewis G. J. Immunol., 1958, 80, 1, 12.
13. Girard J. Int. arch. allergy, 1967, 32, 294.
14. Gough J., Elves M., Israels M. Exp. Cell. Res., 1965, 38, 3, 476.
15. Hashem N. Lancet, 1965, 2, 7415, 742.
16. Hirschhorn K., Bach F., Kolodny R., Firschen I., Hashem N. Sci., 1963, 142, 3596, 1185.

17. Hungerford D., Donnelly A., Nowell P., Beck S. *Am. J. Human. Genet.*, 1959, 11, 3, 215.
18. Lamvik J. *Acta Haemat.*, 1966, 36, 5—6, 335.
19. Ling N., Spicer E., James K., Williamson N. *Brit. J. Haemat.* 1965, 11, 4, 421.
20. Oppenheim J., Whang J., Frei E. *J. Exp. Med.*, 1965, 122, 4, 651.
21. Pearmain G., Lycette R., Fitzgerald P. *Lancet*, 1963, 1, 7282, 637.
22. Sabesin S. *Lancet*, 1965, 2, 7406, 294.