ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

Էքսպեր. և կլինիկ. բժշկ. հանդես

XII, № 6, 1972

Журн. экспер. и клинич. медицины

УДК 616—002.77+616.127

А. Е. КАРАПЕТЯН, В. А. МКРТЧЯН, Л. П. МИСКАРЯН, С. А. ЗАКАРЯН, С. А. ИСААКЯН, А. М. ЗАВГОРОДНЯЯ

ПРИМЕНЕНИЕ РЕАКЦИЙ БЛАСТОИДНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ И ТОРМОЖЕНИЯ МИГРАЦИИ МАКРОФАГОВ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ РЕВМАТИЧЕСКОЙ ПОВЫШЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

Предпринята попытка изучить трансформационную способность лимфоцитов периферической крови и миндалин больных ревматизмом в период ревматической атаки в присутствии различных антигенов. Кроме указанной реакции, использован довольно редко применяемый в иммунологической диагностике ревматизма тест торможения миграции макрофагов с последующим высчитыванием индекса миграции (ИМ).

Результаты исследований показали, что примененные реакции оказались положительными в период репрессии заболевания (у 14 из 15 больных). При этом образуются до 25% бластов, а ИМ бывает меньше 0,6. В случаях культивирования клеток без антигена или с неспецифическим антигеном (туберкулин) положительных результатов не удается выявить (бласты отсутствуют, ИМ>07).

Аналогичные результаты характерны и для случаев острого суставного ревматизма, т. е. лимфоциты не трансформируются в бласты, а ИМ>0,75. Однако здесь замечается феномен спонтанной трансформации клеток.

Для контрольных исследований изучалась культура клеток, полученная от больных туберкулезом. У 25 больных туберкулезным процессом туберкулин стимулировал бластогенез в 23 случаях, при этом процент бластов был ниже при активном процессе. ИМ у 23 больных<0,6, а у 2>0,6.

В этих культурах добавление стрептококкового аллергена не сопровождалось появлением бластов и торможением миграционной способности макрофагов.

Авторы заключают, что обе реакции пригодны для индикации ревматической аллергии in vitro, однако предпочтение отдают тесту торможения миграции макрофагов.

В настоящее время хорошо известно, что в патогенезе системных поражений соединительной ткани и миоцитов миокарда при ревматизме значительную роль играет гиперчувствительность замедленного типа—ГЗТ [9, 13].

Так как реакция ГЗТ опосредуется иммуноцитами, в основном лимфоцитами [15, 18], становится возможным выявление специфической сенсибилизации этих клеток тестами in vitro.

Для выполнения этой задачи обычно используются реакции бласттрансформации лимфоцитов и цитотоксический тест иммунных лимфоцитов на клетки-мишени гомологических тканей.

Целью настоящей работы является сравнительное изучение трансформационных потенций лимфоцитов периферической крови и миндалин больных острым и хроническим ревматизмом в присутствии различных антигенов.

Кроме указанной реакций, нами использовался также довольно редко применяемый в иммунологической диагностике ревматизма тест ингибирования миграции макрофагов.

Для опытов были использованы две клеточные системы: лимфоциты гепаринизированной периферической крови, полученные после осаждения эритроцитов с помощью желатины [5], и клетки, полученные из тонзиллэктомированных миндалин. Для получения последних миндалины в асептических условиях тщательно промывали стерильным изотоническим раствором поваренной соли. Для выяснения характера микрофлоры миндалин и приготовления бактериального аллергена жидкость собирали и центрифугировали при 6000 об/мин. в течение 20 минут. Полученный таким способом осадок засеивали на сахарный агар. Сами же миндалины после промывки размельчали ножницами в растворе Хэнкса, и полученную клеточную взвесь (в основном малые лимфоциты) пропускали через четырехслойную марлю, после чего центрифугировали в течение 5 мин. при 1000 об/мин. Осадок в дальнейшем ресуспендировали в среде Игла, содержащей 10% нормальной лошадиной сыворотки с антибиотиками (200 ед/мл пенициллина и 100 ед/мл стрептомицина).

Опыты in vitro ставились со следующими антигенами: стрептолизин—О (0,05—0,1 мл 5%-ного раствора); сухой очищенный туберкулин (0,1 мл 5%-ного раствора); аллерген, полученный из бактерий, выделенных из изологичных миндалин [6], и тканевой антиген, приготовленный из стромы миндалин. Последний готовили следующим образом: после удаления клеточных элементов размельченную стромальную ткань миндалин взвешивали и на каждый грамм добавляли по 5—7 мл физиологического раствора NaCl. После этого ткань в ступке растирали с кварцевым песком. Полученную взвесь центрифугировали в течение 5 мин. при 2000 об./мин., осторожно отсасывали надосадочную жидкость, которую и использовали в качестве антигена (по 0,025—0,05 мл).

Реакция иммунобластической трансформации лимфоцитов и оценка полученных результатов проводилась по методике, описанной Н. И. Брауде и И. Л. Гольдман [2].

Для постановки реакции торможения миграции макрофагов по Блюм и Беннет [14] клеточную взвесь, полученную из периферической крови и миндалин, предварительно в течение 2 суток инкубировали при 37° в питательной среде (среда Игла—90%, нормальная лошадиная сыворотка—10% с антибиотиками). За это время часть элементов культуры, в основном малые лимфоциты, трансформировались в макрофаги. По истечении этого срока клетки с помощью центрифугирования собирали в пробирки с последующим засасыванием в силиконизированные стерильные капиллярные трубки диаметром 1,4 мм и длиной 5 см и снова центрифугировали при 1000 об./мин. в течение 5 мин. После этого трубки разрезали на уровне клеточного осадка и с помощью парафина прикрепляли ко дну специальных камер, содержащих 1 мл среды Игла. В дальнейшем в камеры добавляли соответствующие антигены в вышеупомянутой дозе.

В контрольные камеры вносили туберкулин (при ревматизме), стрептолизин—0 (при туберкулезе легких) или же их инкубировали без антигена.

Для инкубации камеры помещали в термостат при 37°, учет реакции производили спустя 24 ч. В положительных случаях, когда какой-нибудь антиген являлся источником сенсибилизации лимфоцитов, выход клеток из трубки задерживался. В отличие от этого в контрольных камерах наблюдался заметный выход макрофагов из трубок.

Индекс миграции (ИМ) определяли по формуле $ИМ = \frac{М+АГ}{М}$, где числитель показывает размеры зон миграции макрофагов в миллиметрах при наличии антигена, а знаменатель—размеры зон миграции без антигена [33]. Реакцию считали положительной, если при наличии антигена ИМ был меньше—0,6.

Исследования показали, что реакции бласттрансформации лимфоцитов и торможения миграции макрофагов под действием стрептококковых антигенов положительны у 14 из 15 больных хроническим ревматизмом (табл. 1). При этом образовывалось до 25% бластов (остальные клетки культуры составляли малые лимфоциты, макрофаги и единичные фибробластоподобные клетки), а ИМ был меньше 0,6.

В контрольных камерах при внесении туберкулина результаты были отрицательными, т. е. бласты не обнаруживались, а ИМ=1. Стромальный антиген миндалин стимулировал до 5% бластов, а ИМ был больше 0,7.

Если вместо оптимальной дозы стрептолизина—0 добавляли несколько большие его концентрации (1—2 дозы), то нередко наблюдали резко выраженное снижение числа клеток в культуре (в основном за счет снижения количества лимфоцитов) независимо от того, в культуральной среде присутствовал комплемент морской свинки или нет.

У больных с острым суставным ревматизмом, имевших высокие показатели антистрептококковых гуморальных антител, обнаружить ГЗТ с помощью примененных in vitro тестов не удалось. Однако здесь в отличие от предыдущей группы при отсутствии гомологичного антигена наблюдалась спонтанная трансформация 4—5% лимфоцитов в бласты (феномен спонтанной трансформации). При этом ИМ был больше 0,75. Отрицательный результат получен при добавлении туберкулина. Из 10 больных с активным течением туберкулеза легких туберкулин стимулировал бластогенез у 8 (около 15—20% трансформированных клеток). Процент бластов был выше во второй подгруппе у всех 15 больных (больше 25%). Индекс миграции у 23 больных меньше 0,6, а у 2 больше 0,6. Стрептококковые антигены у туберкулезных больных не задерживали выхода макрофагов из стеклянных трубок и не стимулировали бластогенез.

У практически здоровых лиц (5 чел.) при использовании всех упомянутых антигенов бластогенеза не наблюдалось и отсутствовал феномен торможения миграции макрофагов.

Таблица 1

Результаты постановки тестов бласттрансформации и задержки миграции макрофагов у различных групп обследованных

Группы обследованных		Число случаев	Лимфоциты		Число людей с положит. реакцией бласттранс. и торможения миграции	Процент бластов и индекс при применении антигенов								Спонтанная трансформация	
			крови	миндалин		стрептолизин		стромальный		бактериальный		туберкулин		число случаев	средний процент
						БТ	ИМ	БТ	ИМ	БТ	ИМ	БТ	ИМ		
Ревматизм	острый	15	15	—	—	0	—	1	0,7	0	0,7	0	1	14	9,2±0,8
	хронический	15	14	15	15	22,1±1,5	0,6	4,8±0,5	0,7	20,2±0,8	0,6	0	1	—	—
Туберкулез	активный	10	8	—	8	0	0,8	0	0,8	1	0,8	18,2±0,8	0,6	2	3,5±1,2
	вне стадии обострения	15	15	—	15	0	0,8	0	0,8	1—2	0,8	25±0,5	0,6	—	—
Практически здоровые		10	10	—	0	1	0,9	0	0,9	0	0,9	0	0,9	3	1

Примечание: БТ — бласттрансформация; ИМ — индекс миграции.

Полученные нами данные можно рассматривать как результат специфической перестройки иммунологической реактивности организма, обусловленной взаимоотношением антиген-лимфоцит. Это предположение основывается на таких фактах, как способность лимфоцитов синтезировать трансплантационные антитела и вырабатывать фактор переноса замедленной аллергии [16]. Одновременно малые лимфоциты являются клетками-хранителями иммунологической памяти [19] и in vitro реагируют с гомологичным антигеном по типу реакции second set [18], оказывая при этом цитотоксический эффект на гомологичные клетки в культуре ткани [3].

В связи с этим трансформация лимфоцитов в бласты у больных ревматизмом в неактивной стадии и туберкулезом свидетельствует о наличии клеток-памяти in vivo, которые, in vitro встречаясь со специфическим антигеном, дают вторичную иммунологическую реакцию. Возникает вопрос, почему этого не наблюдается при обострении ревматического процесса [21].

По-видимому, здесь определенное значение приобретают сывороточные факторы—ингибиторы бластогенеза, или же имеет место избыток антигена в культуре (сумма сывороточных и добавленных антигенов). За это говорят данные В. И. Иоффе [6] и И. М. Лямперт [9], показавшие, что у больных ревматизмом в период атаки уровень стрептококковых антигенов в сыворотке крови повышается.

Отсутствие положительной бластоидной реакции у больных с активным туберкулезом, вероятно, связано с тем, что в этой стадии заболевания превалируют реакции замедленного типа и в сыворотке появляются некие вещества белковой природы, тормозящие образование бластов [20].

Наблюдаемая спонтанная трансформация в активной стадии ревматизма и туберкулеза, по всей вероятности, является ответом лимфоцитов на антигены, имеющиеся в плазме крови этих больных.

Образование бласт-клеток в присутствии тканевого антигена (до 5%) подтверждает мнение о том, что при стрептококковой гиперчувствительности инфекционный агент меняет свойства собственных тканей (особенно соединительной ткани) таким образом, что они приобретают аутоантигенные свойства.

Низкий процент бласт-клеток в данном случае нельзя полностью считать результатом слабой сенсибилизации лимфоцитов, возможно, что это зависит и от способа приготовления и силы тканевого антигена.

Результаты, полученные при постановке реакции торможения миграции макрофагов под воздействием специфического антигена, в основном коррелировали с бластоидной реакцией лимфоцитов как при ревматизме, так и при туберкулезе.

Несмотря на то, что окончательный механизм этой реакции еще не выяснен, большинством исследователей признается, что клетки, ответственные за синтез ингибирующего фактора,— это сенсибилизированные лимфоциты, а макрофаги являются лишь клетками-индикаторами [17, 20].

Нам кажется, что в основе тех случаев, когда у больных с положительной реакцией бласттрансформации не наблюдалось подавления миграции макрофагов, лежат ошибки технического порядка, так как при несоблюдении определенных правил даже на фоне специфической сенсибилизации можно получить недостоверные результаты [21].

Приведенные данные показывают, что тест подавления миграции макрофагов, наряду с бластоидной реакцией, является довольно чувствительным для индикации повышенной чувствительности организма и должен широко применяться при иммунологической диагностике ревматизма и других патологических состояниях, в механизме развития которых главную роль играют гиперергические реакции замедленного типа, т. е. сенсибилизированные лимфоциты.

Выводы

1. Реакция бласттрансформации в стадии ремиссии ревматизма оказалась положительной у 14 из 15 больных, а при остром суставном ревматизме она была отрицательной.

2. Тест ингибирования миграции макрофагов из капиллярных трубок в присутствии специфического антигена оказался положительным у 14 из 15 больных ревматизмом в стадии ремиссии и у 23 из 25 больных туберкулезом легких.

У больных с острым суставным ревматизмом и у двух с активным туберкулезным процессом в легких при добавлении специфического антигена они оказались отрицательными.

3. Реакция торможения миграции макрофагов является довольно чувствительным тестом и может применяться для определения активности ревматического процесса наряду с другими диагностическими методами.

Институт кардиологии МЗ АрмССР

Поступила 24/V 1972 г.

Ա. Ե. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Վ. Ա. ՄԿՐՏՉՅԱՆ, Լ. Պ. ՄԻՍԿԱՐՅԱՆ, Ս. Ա. ՋԱՔԱՐՅԱՆ,
Ս. Ա. ԻՍԱՀԱԿՅԱՆ, Ա. Մ. ՋԱՎԳՈՐՈԴՆՅԱՅԱ

ԼԻՄՖՈՑԻՏՆԵՐԻ ԲԼԱՍՏՏՐԱՆՍՖՈՐՄԱՑԻԱՅԻ ԵՎ ՄԱԿՐՈՖԱԳՆԵՐԻ ՇԱՐԺՈՒՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՃՆՇՄԱՆ ՌԵԱԿՑԻԱՆԵՐԻ ՕԳՏԱԳՈՐԾՈՒՄԸ ՌԵՎՄԱՏԻԿ ԳԵՐԶԳԱՅՆՈՒԹՅԱՆ ՀԱՅՏՆԱԲԵՐՄԱՆ ՀԱՄԱՐ

Ամփոփում

Հեղինակները նպատակ են ունեցել հայտնաբերել ստրեպտոկոկային և տուբերկուլինային գերզգայնությունը ռևմատիզմով ու տուբերկուլյոզով տառապող հիվանդների մոտ։ Փորձերի արդյունքները ցույց են տվել, որ սուր

Հոդային ռևմատիզմի ժամանակ ստրեպտոկոկային ալերգենի ազդեցության տակ լիմֆոցիտները չեն վերափոխվում իրենց բլաստային ձևերին և մակրոֆագների շարժունակությունը ճնշող նյութեր չեն արտադրում։ Հակառակ երևույթն է դիտվում ռևմիսիայի շրջանում գտնվող հիվանդների մոտ՝ երկու ռեակցիաների արդյունքներն էլ լինում են դրական։ Տուբերկուլյոզով հիվանդների մոտ, անկախ սրության աստիճանից, նկատվում է բլաստ-բջիջների առաջացում և մակրոֆագների շարժունակության ճնշում։

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бернет М.* Клеточная иммунология. М., 1971.
2. *Брауде Н. И., Гольдман И. Л.* Известия АН СССР (сер. биол.), 1967, 6, стр. 851.
3. *Брондз Б. Д.* В кн.: Вирусы, рак, иммунитет. М., 1965, стр. 352.
4. *Вязова О. И., Акифьев А. П., Коган Э. М., Немировский Т. Е.* В кн.: Актуальные проблемы пересадки органов. М., 1969, стр. 11.
5. *Завгородняя А. М.* Канд. дисс. Ереван, 1969.
6. *Иоффе В. И.* Иммунология ревматизма. Л., 1962.
7. *Линг Н. Р.* Стимуляция лимфоцитов. М., 1971.
8. *Лямперт И. М., Грызлова О. Н., Белецкая Л. В., Данилова Т. А.* Вопросы ревматизма, 1964, 4, 3, стр. 92.
9. *Лямперт И. М.* Этиология, иммунология и иммунопатология ревматизма. М., 1972.
10. *Мкртчян А. А., Зурабян А. С., Мискарян Л. П. и др.* Труды Института курортологии и физических методов лечения им. А. А. Акопяна. Ереван, 1970, стр. 313.
11. *Смирнова М. Н., Лямперт И. М., Семина Н. А.* Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1965, 60, 2, стр. 62.
12. *Струков А. И., Симакова Р. П., Кольева Т. Н., Кактурский Л. В.* Архив патологии, 1970, 32, 2, стр. 20.
13. *Bendixen G., Soborg M.* J. Immunol., 1970, 104, 6, 1551.
14. *Bloom B. R., Bennet B.* Ann. N. Y. Acad. Sci, 1970, 169, 1, 258.
15. *David J. R., Lawrence H. S., Thomas L.* J. Immunol., 1964, 93, 2, 274.
16. *Hanaoka M.* Annual. Rept. Inst. Res., Kyoto Univ., 1968, 9, 30.
17. *Mekler L. B.* Nature (Engl.), 1967, 215, 5100, 481.
18. *Najarian J. T., Feldman J. D.* J. Exp. Med., 1963, 118, 5, 759.
19. *Passaleva A., Romagnani S.* et al. Folia allergol., 1967/1968, 14, 6, 621.
20. *Schäfer H., Wittke H., Naferkamp O.* Wurchows. Arch. pathol. Anat. and Physiol., 1966, 341, 2, 133.
21. *Soborg M., Benolixen G.* Acta med. Scand., 1967, 181, 2, 247.