

Ильбо МЕСИПУУ, *Олев ПЫДЕР*, *Ааде ТЭДЕР*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ Т-СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ И ЛИМФЕ ОВЕЦ МЕТОДОМ РОЗЕТКООБРАЗОВАНИЯ

В обеспечении иммунного гомеостаза важное значение имеет способность лимфоидных клеток организовать иммунологический надзор за генетической индивидуальностью организма. Главным атрибутом названной функции является свойство лимфоцитов рециркулировать в организме. Именно постоянно рециркулирующие лимфоидные клетки имеют возможность контакта с любыми тканевыми участками тела.

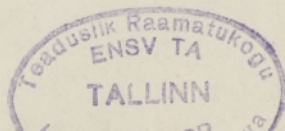
Выяснение деятельности центральных лимфоидных органов — тимуса, костного мозга и фабрицевой сумки, а также *T*- и *B*-клеточных систем, заметно упрочило наши знания в области физиологии иммунной системы. Например, известно, что благодаря хорошо выраженной способности к рециркуляции клетки тимус-зависимой субпопуляции лимфоцитов (*T*-клетки) являются существенными элементами звена, ответственного за формирование иммунной реакции в организме (Арипов и др., 1976).

Установление двух систем клеточного иммунитета представляло значительный теоретический и практический интерес для разработки наиболее надежных простых методов оценки каждой системы. Среди методов изучения клеток тимус-зависимой субпопуляции лимфоцитов широкое распространение получила реакция розеткообразования лимфоцитов с гетеро- или гомологичными эритроцитами (тест Е-РОК). Этот способ основывается на способности каждой субпопуляции лимфоцитов своими рецепторами связывать определенный тип эритроцитов животных или человека. При этом использованные в виде суспензии эритроциты образуют розетки вокруг связывающих их лимфоцитов (Новиков, Новикова, 1979).

Впервые названный феномен был описан в 1964 г. (Zaalberg, 1964). Дальнейшие исследования этого явления (Jondal и др., 1972; Петров и др., 1976; Череев, 1976 и др.) показали, что выработанные тесты Е-РОК позволяют разделить *T*- и *B*-системы лимфоцитов.

К настоящему времени разработан ряд методов определения *T*- и *B*-лимфоцитов с помощью тестов Е-РОК, позволяющих получить довольно хорошие результаты при исследовании лимфы человека. К сожалению, названные методы в оригинальном виде применительно к животным удовлетворительных результатов не дают и требуют при этом довольно существенных модификаций.

Целью настоящего исследования было найти подходящий способ выделения лимфоцитов из крови и лимфы грудного протока у овец и разработать эффективный метод выявления *T*-лимфоцитов с помощью реакции розеткообразования.



Материал и методика

Исследования проводили на 50 клинически здоровых баранах эстонской темноголовой породы в возрасте 1—2 года. У 17 из них для получения пробы лимфы хирургическим методом был наложен (Месипуу, 1973) между грудным протоком и яремной веной экстракорпоральный лимфo-венозный анастомоз.

Разработанный и предложенный нами тест для определения розеткообразующих клеток у овец заключается в следующем: лимфоциты отделяют от других клеток крови или лимфы с помощью градиентного центрифугирования с раствором фиколла—верографина (12 частей 9%-ного фиколла и 5 частей 33,9%-ного верографина) или только верографина (14,3%-ный раствор в дистиллированной воде) с удельным весом 1,076 и рН 7,35.

Для этого раствор градиента разливают по 5 мл в 2 центрифужные пробирки, куда осторожно накладывают по 5 мл гепаринизированной крови (0,2 мг гепарина на 1 мл крови). Если в качестве градиента применяют смесь фиколла—верографина, то кровь разбавляют забуференным физиологическим раствором в 2—3 раза. При использовании только верографина кровь не разводят. Заполненные пробирки осторожно помещают в лунки центрифужных стаканов, после чего их центрифугируют при 400 g в течение 40 мин. После центрифугирования на дне пробирок образуется осадок эритроцитов и гранулоцитов, а над ними слой градиента и плазмы. Под нижней границей слоя плазмы располагается тонкий слой мононуклеарo-лимфоцитов (рис. 1). Этот слой осторожно отсасывают, переносят в круглодонную центрифужную пробирку, куда предварительно внесено 5 мл забуференного физиологического раствора. Лимфоциты осаждают центрифугированием при 200 g в течение 15 мин. При необходимости аутоэритроциты разрушают 0,83%-ным раствором хлористого аммония в физиологическом растворе, центрифугируя клеточную суспензию в течение 10 мин при 200 g. Затем взвесь лимфоцитов трижды промывают забуференным физиологическим раствором при 200 g по 10 мин и приготавливают суспензию концентрацией 2×10^6 клеток в 1 мл среды.

Лимфоциты из лимфы выделяют центрифугированием при 200 g в течение 15 мин, после чего их промывают забуференным физиологическим раствором. Если лимфа содержит много эритроцитов, лимфоциты можно выделить из нее, как и из крови, т. е. с помощью градиентного центрифугирования.

Для выявления T-лимфоцитов из крови и лимфы овец реакцией розеткообразования была использована модифицированная нами методика, успешно применяемая у человека (Vach, 1973). Для этого использовали эритроциты другого барана — донора, от которого брали по 5 мл крови и готовили из них 1%-ную суспензию эритроцитов в забуференном физиологическом растворе. Приготовленную и хранившуюся в холодильнике суспензию можно использовать в течение одной недели.

Сущность метода определения розеткообразующих T-лимфоцитов заключается в следующем. В плоскодонные центрифужные пробирки пипетируют 0,1 мл суспензии клеток, содержащей в 1 мл 2×10^6 лимфоцитов, и добавляют к этому 0,1 мл 1%-ной суспензии бараньих эритроцитов и 0,1 мл 6%-ного раствора декстрана молекулярным весом 90 000—120 000. Содержимое пробирок инкубируют в водяном термостате при 25°C 30 мин. Сразу же после истечения этого времени осаждают клетки центрифугированием при 200 g в течение 5 мин и инкубируют их 1 ч в холодильнике при 4°.

Для фиксации образовавшихся розеток в пробирку добавляют 0,04 мл 0,3%-ного глютаральдегида и ставят пробирки на 18—20 ч в холодильник при 4°.

На следующий день осадок фиксированных клеток осторожно ресуспендируют и промывают 5 мл дистиллированной воды, центрифугируя в течение 10 мин при 200 г. Конечное промывание дистиллированной водой устраняет кристаллизацию солей физиологического раствора и при высыхании дает ровные мазки, которые после фиксации на стекле окрашивают по Романовскому. В препаратах считают не менее 300 клеток и вычисляют относительное содержание розеткообразующих клеток. К розеткам относят лимфоциты, тесно адсорбирующие на своей поверхности не менее 3 эритроцитов.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты опытов позволяют считать, что с помощью градиентного центрифугирования из крови и лимфы овец можно получить высокоочищенную суспензию лимфоидных клеток. При этом необходимо отметить, что выход клеток из крови и лимфы зависит от использованного градиента.

Сравнение этапа получения взвеси лимфоцитов с помощью градиентной смеси фиколла—верографина или только верографина показало, что в первом случае выход лимфоцитов был на 10—20% больше, чем во втором. Данные наших исследований полностью поддерживают предположение (Векслер и др., 1978), что для выделения взвеси лимфоцитов можно использовать верографин без добавления дефицитного препарата фиколла. Выход лимфоцитов из 5 мл крови овец при использовании обоих градиентов был в среднем 8—9 млн. клеток, а из лимфы в 4—5 раз больше.

При исследовании реакции розеткообразования в лимфе у овец для сравнения были использованы эритроциты человека и различных видов животных — крысы, мыши, кролика, курицы, свиньи, крупного рогатого скота, лошади и барана. При этом наибольшее число розеток с лимфоцитами барана дала суспензия гомологичных эритроцитов.

Спонтанное розеткообразование представляет собой активный процесс. На прилипание эритроцитов к лимфоцитам способны влиять различные химические и биологические активные вещества. Для увеличения числа выявляемых T-лимфоцитов многие исследователи рекомендуют добавлять к клеточной взвеси при инкубации инактивированную сыворотку, яичный альбумин, бычий сывороточный альбумин, телячью эмбриональную сыворотку, а также декстраны (Гирюнас и др., 1978; Чердеев, 1976; Vinns, 1978 и др.). С этой целью мы применяли 6%-ный раствор декстрана, который добавляли в количестве 0,1 мл к клеточной суспензии перед ее инкубацией в водяном термостате.

При анализе реакции Е-РОК необходимо учитывать, что образующиеся клеточные розетки в течение всяких предусмотренных манипуляций легко распадаются. Во избежание этого используют фиксирующее клетки вещество — глютаральдегид. Исходя из наших опытов, можно предположить, что увеличение добавляемой концентрации раствора глютаральдегида больше 1% в основном дает большое количество клеточных конгломератов, что в дальнейшем существенно затрудняет анализ результатов. При этом необходимо отметить, что даже осторожное взбалтывание пробирок перед фиксацией клеточной суспензии, как это иногда рекомендуют (Ляпон, 1980), удовлетворительных результатов

Содержание розеткообразующих *T*-лимфоцитов в крови
и лимфе овец, полученное методом Е-РОК, %

В крови	В лимфе
$M \pm m = 17,77 \pm 1,58$	$M \pm m = 22,82 \pm 2,89$
$\sigma = \pm 7,39$	$\sigma = \pm 11,89$
$n = 22$	$n = 17$
lim = 8—35	lim = 11—53

не дает. Поэтому мы не советуем повышать концентрацию глютаральдегида, а удлинять только время фиксации. Предварительные опыты показали, что удлинение времени фиксации до 18 ч (когда пробы находятся в холодильнике) повышало розеткообразование лимфоидных клеток.

Из полученных результатов (таблица) следует, что в крови овец с помощью модифицированного нами теста Е-РОК количество *T*-субпопуляции лимфоцитов (рис. 1) составляет $17,7 \pm 1,58\%$, а в лимфе $22,82 \pm 2,89\%$ от общего количества лимфоцитов. Статистическая обработка данных показала, что разница в относительном содержании *T*-лимфоцитов в крови и лимфе не достоверная ($P > 0,05$). При этом, однако, необходимо учесть, что абсолютное количество всех лимфоцитов в 1 мл лимфы, как это показали опыты выделения лимфоцитов из лимфы и наши более ранние исследования (Месипуу, 1976), было в 3—4 раза выше, чем в 1 мл крови. Таким образом, можно предположить, что лимфа грудного лимфатического протока является важным путем циркуляции тимус-зависимой субпопуляции лимфоцитов в организме.

Анализ результатов наших исследований процесса спонтанного розеткообразования у лимфоидных клеток крови и лимфы овец и экспериментальные данные некоторых других исследователей (Гирюнас и др., 1977; Binns, 1978; Galkowska, Olszewski, 1979) позволяют предполагать, что у животных (по сравнению с человеком) циркулирующие с лимфой и кровью лимфоидные клетки существенно меньше дифференцированы. Основной пул из них составляют незрелые или нулевые клетки, не способные к образованию спонтанных розеток с чужими эритроцитами. Сущность этого явления не ясна, но, несомненно, связана с видовыми особенностями иммунных механизмов, расшифрование которых для выяснения общих закономерностей созревания лимфоидных клеток можно считать очень важным.

Метод, модифицированный нами для определения *T*-субпопуляции лимфоцитов у овец, создает возможность решить названные выше проблемы и позволяет широко исследовать различные факторы, влияющие на дифференцирование и циркуляцию иммунокомпетентных клеток в организме.

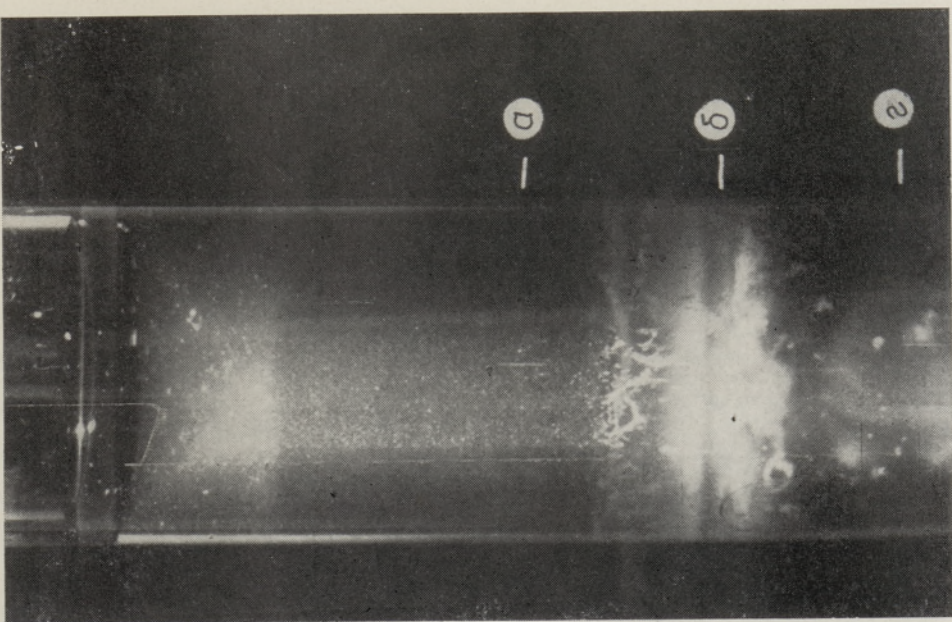
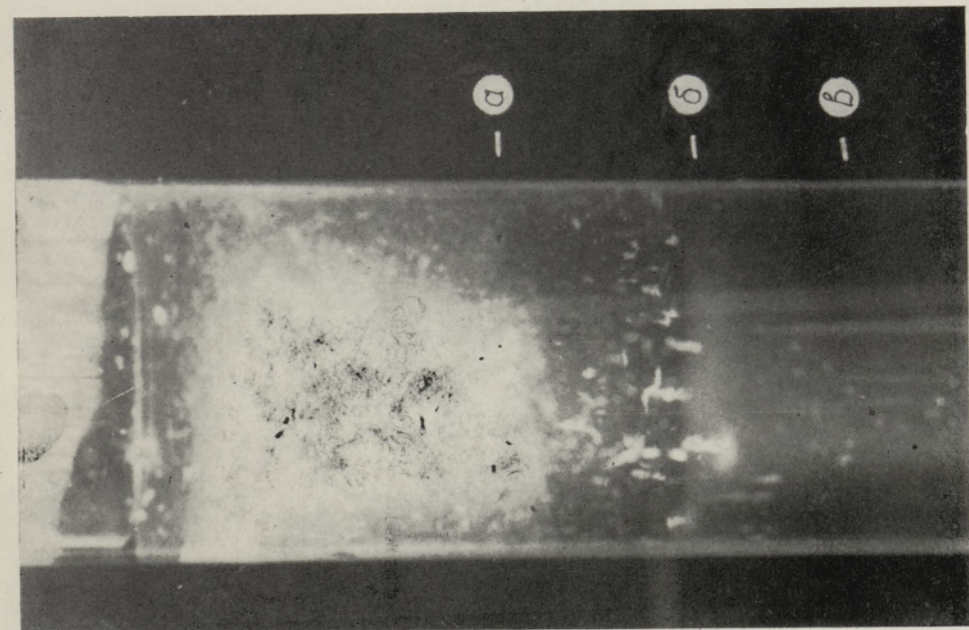
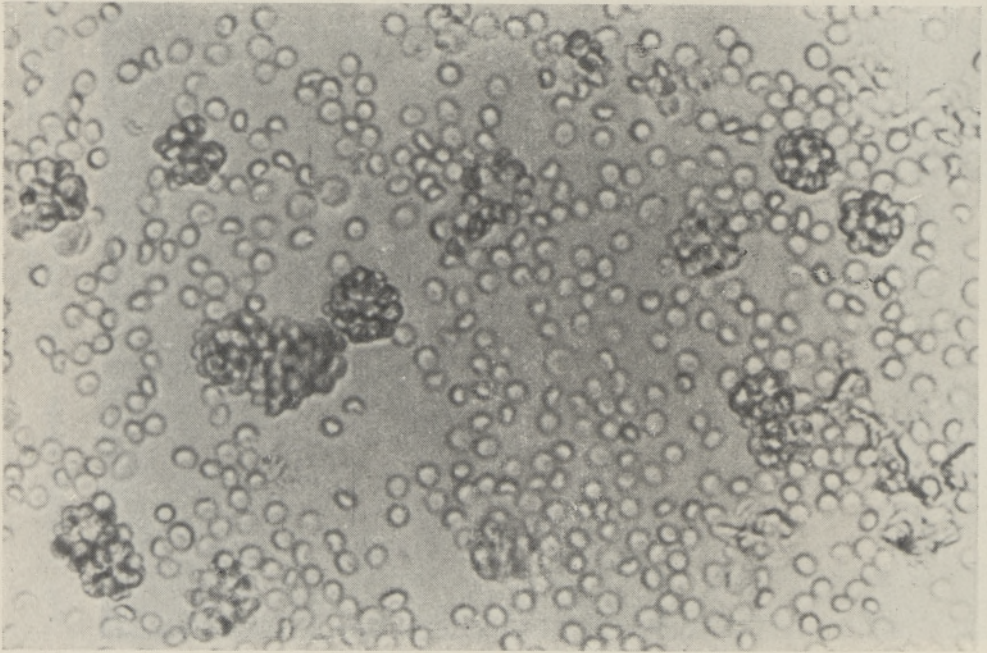
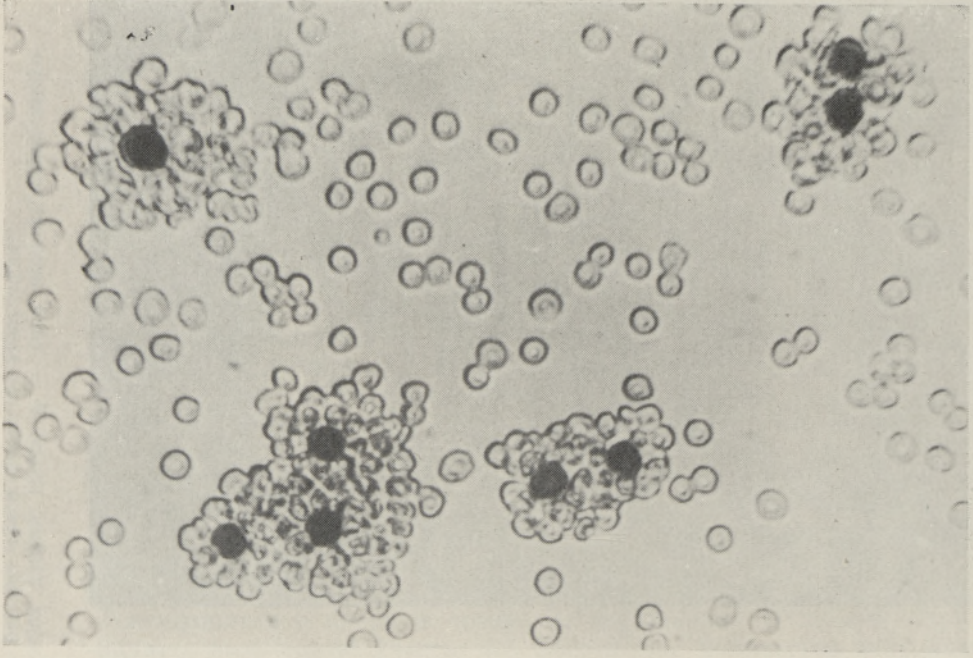


Рис. 1. Пробы крови после градиентного центрифугирования. а — слой плазмы крови, б — слой мононуклеаров-лимфоцитов, в — раствор верографина, г — раствор смеси фикоλλα—верографина.



а



б

Рис. 2. Препараты с розеткообразующими Т-лимфоцитами. а — шарикообразные розетки до высыхания, б — то же в окрашенном виде.

ЛИТЕРАТУРА

- Арипов И. А., Арустамов Д. А., Хаитов Р. М. Клеточные основы иммунного ответа и иммунодепрессия. Ташкент, 1976.
- Векслер Х. М., Сочнев А. М., Попова О. В. Сравнительное изучение методов получения фракций лимфоцитов периферической крови, обогащенных Т- и В-лимфоцитами. — В кн.: Новые иммунорегулирующие препараты и иммунологические методы. Рига, 1978, 39—44.
- Гирюнас В. Ю., Домкус В. С., Садаускас П. Б. Выделение лимфоцитов из периферической крови здоровых коров. — Тр. АН ЛитССР, сер. В, 1977, 4, 80, 115—119.
- Гирюнас В. Ю., Маркявичюс А. И., Домкус В. С., Садаускас П. Б. Выявление розеткообразующих лимфоцитов в периферической крови здоровых коров. — Тр. АН ЛитССР, сер. В, 1978, 3, 82, 79—83.
- Ляпон А. О. Комплексный анализ Т-лимфоцитов в тесте розеткообразования. — Лабора. дело, 1980, 1, 36—39.
- Месипуу И. В. Получение лимфы животных в хроническом эксперименте. — Сб. Инст. эксперим. биол. АН ЭССР. Таллин, 1973, 14—18.
- Месипуу И. В. О влиянии гормонов на клеточный состав лимфы. — Мат. симп. «Венозное кровообращение и лимфообращение». Алма-Ата, 1976, 2, 75—80.
- Новиков Д. К., Новикова В. И. Клеточные методы иммунодиагностики. Минск, 1979.
- Петров Р. В., Стенина М. А., Лебедев К. А. Особенности оценки количества Т-лимфоцитов и других розеткообразующих клеток в крови здоровых и больных людей. — Бюл. эксперим. биол., 1976, 2, 197—199.
- Чередеев А. Н. Количественная и функциональная оценка Т- и В-системы иммунитета. — В кн.: Общие вопросы патологии. Итоги науки и техники. М., 1976, 124—153.
- Vach, J. F. Evaluation of T-cells and thymic serum factors in man using the rosette technique. — Transpl. Rev. 1973, 16, 196—217.
- Binns, R. M. Sheep erythrocyte rosettes in pigs, sheep, cattle and goats demonstrated in the presence of dextran. — J. Immun. Methods. 1978, 21, 197—210.
- Galkowska, H., Olszewski, W. Cell subpopulations in prenatal lymph of normal dogs. — Abstracts of VII International Congress of Lymphology. Florence, 1979, 303.
- Jondal, M., Holm, G., Wigzell, H. A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes with sheep red blood cells. — J. Exp. Med., 1972, 136, 207—216.
- Zaalberg, O. B. A simple method for detecting single antibody-forming cells. — Nature, 1964, 202, 1231—1232.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
22/IV 1980

Ilbo MESIPUU, *Olev PÖDER*, *Aade TEDER*

LÜMFOTSÜÜTIDE T-SUBPOPULATSIOONI MÄÄRAMINE LAMMASTE VERES JA LÜMFIS ROSETIMEETODIL

Artikkel käsitleb lammaste veres ja lümfis sisalduvate T-lümfotsüütide määramise meetodikat. Uuritud 50-st katseloomast 17-1 moodustati lümfi saamiseks kunstlik anastomoos lümfi- ja veresoonte vahel. Lümfotsüüdid tsentrifuugiti gradiendis (fikoll-verografiini või verografiini lahuses). Sel viisil oli võimalik eraldada 5 ml-st verest 8—9 milj. lümfotsüüti, samast kogusest lümfist aga 3—4 korda rohkem lümfotsüüte. Kasutades inimestel rakendatavat T-lümfotsüütide määramise testi (modifitseerituna), selgitati, et lammaste veres ja lümfis esineb T-lümfotsüüte vastavalt $17,77 \pm 1,58\%$ ning $22,82 \pm 2,89\%$. Artikli autorite kirjeldatud test võimaldab selgitada immunoloogiliselt kompetentsete rakkude tsirkulatsiooni ja diferentseerumist loomorganismis ning loob tingimused neid mõjutavate tegurite lähemaks uurimiseks.

Ilbo MESIPUU, *Olev PÖDER, Aade TEDER*

BESTIMMUNG DER T-SUBPOPULATION DER LYMPHOZYTEN IM BLUT UND IN DER LYMPHE DER SCHAFE ANHAND DER ROSETTEN-TECHNIK

Im vorliegenden Artikel werden methodische Fragen zur Bestimmung der T-Lymphozyten im Blut und in der Lymphe der Schafe behandelt. 50 Schafe wurden den Forschungen unterzogen. Für die Erhaltung der Lymphproben hat man bei 17 Schafen eine lymphovenöse Anastomose zwischen *Vena Jugularis* und *Ductus Thoracicus* gebildet. Die Lymphozyten wurden mit Gradientenzentrifugierung (aus der Fikoll-Verographin bzw. Verographinlösung) ausgetrennt. Aus 5 ml Blut wurden 8—9 Millionen, aus der gleichen Lymphmenge aber 3—4mal mehr Lymphozyten erhalten. Die modifizierte Anwendung des Testes zur Bestimmung der T-Lymphozyten bei Menschen ergab, daß der Prozentsatz der T-Lymphozyten im Blut und in der Lymphe der Schafe entsprechend bei $17,77 \pm 1,58$ und $22,82 \pm 2,89$ liegt.

Die beschriebene Methode ermöglicht die Untersuchung der Zirkulations- und Differenzierungsprozesse bei immunologisch kompetenten Zellen.