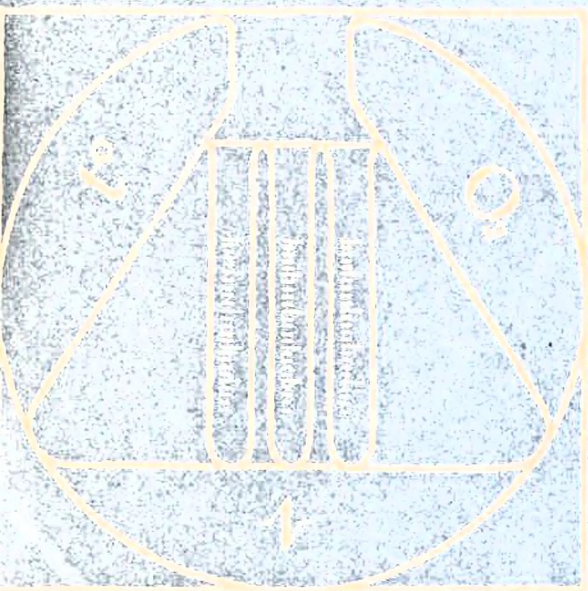


ЛАБОРАТОРНОЕ ДЕЛО 3



Москва
Медицина. 1987

МИКРОБИОЛОГИЯ

ГЕМАТОЛОГИЯ

БИОХИМИЯ

ИММУНОЛОГИЯ

ОБОРУДОВАНИЕ

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

ЮБИЛЕИ

8. Finegold S. M. // Arch. intern. Med.— 1982.— Vol. 142.— P. 1988—1992.
9. Satter V. L., Citron D. M., Finegold S. M. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual.— 3th Ed.— London, 1980.

Поступила 29.12.85

APPLICATION OF THE CTO-10-OC SOLID RADIATION WASTE COLLECTOR TO CULTIVATION OF ANAEROBIC BACTERIA. E. P. Pashkov, A. Yu. Mironov

The CTO-10-OC solid radioactive waste collector manufactured by the Izotop amalgamation was modified to be used as anaerostat for cultivation of obligate anaerobes. A hole is drilled in the collector lid, and a metal tube with screw on the end is inserted into the hole. The tube is fixed with nuts and collars, and the hole is sealed with rubber pads. A rubber hose with Kocher's or Billroth's clamp is joined to the tube, the anaerostat is connected with a vacuum pump and a balloon with gas via this hose. The efficacy of the anaerostat was tested in experiments with 18 strains of obligate anaerobes cultivated in liquid nutrient medium with resazurin.

УДК 616.155.32-008.9-092.18-074

Ключевые слова: лимфоциты, популяции, идентификация, цитохимия

Ю. И. Бажора, Б. Н. Пясецкий

ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ (Обзор литературы)

Кафедра биологии и инфекционных болезней Одесского медицинского института им. Н. И. Пирогова

Одним из важных направлений современной иммунологии являются разработка и внедрение в клиническую практику новых доступных методов выявления Т-, В-, «нуль»-лимфоцитов и их субпопуляций. В связи с этим внимание исследователей привлекают методы цитохимической идентификации различных популяций лимфоцитов, имеющие ряд преимуществ перед классическими иммунологическими тестами. Во-первых, при этом упрощается процедура взятия крови, что очень важно для клинической практики (особенно в педиатрии), так как достаточно приготовить два мазка крови (для постановки

цитохимической реакции и для подсчета формулы) и подсчитать количество лейкоцитов в камере Горяева. Во-вторых, указанные исследования может проводить один человек с небольшой затратой времени, поскольку цитохимические методы значительно доступнее иммунологических.

В последние годы выполнен ряд исследований, в которых предприняты попытки изучить специфичность отдельных ферментов для гранулоцитов, лимфоцитов и моноцитов [4, 9, 14, 15]. Толчком к этому послужила необходимость идентификации Т- и В-лимфоцитов и определения их локализации в замороженных срезах различных лимфоидных образований [20]. Полученные результаты свидетельствуют, что лимфоциты периферической крови обладают большим набором различных ферментов, многие из которых присущи и другим клеткам крови [4, 8, 40]. По некоторым ферментам они отличаются от клеток гранулоцитарного ряда [4, 14].

Работа в этом направлении позволила установить, что специфичным ферментом для дифференциации Т- и В-лимфоцитов является неспецифическая эстераза, в частности кислая α -нафтилацетатэстераза [22, 28, 30, 31, 33, 38]. В качестве субстрата для ее определения использовали α -нафтилацетат. При этом Т-лимфоциты дают положительную реакцию на эстеразу — α -нафтилацетатположительная популяция (АНАЭ⁺), которая коррелирует с Е-розеткообразующими клетками (Е-РОК). В-лимфоциты не дают реакции на эстеразу — α -нафтилацетатотрицательная популяция (АНАЭ⁻) [29]. По данным К. Higgy и соавт. [25], идеальным субстратом для выявления эстеразной активности в Т-лимфоцитах крови является α -нафтилбутират. Показано, что в Т-лимфоцитах эстеразная активность имеет плотную гранулярную локализацию. Популяция В-лимфоцитов не дает реакции на этот фермент, а «нуль»-клетки содержат разбросанные гранулы различной величины (см. таблицу). На основании тщательного изучения активности α -нафтилацетатэстеразы в тимусзависимых и тимуснезависимых зонах лимфатических узлов мышей также было показано, что активность фермен-

та встречается в основном в Т-клетках. Это позволило дифференцировать их от В-клеток [27, 35].

Представляют интерес данные, полученные R. Obrist и соавт. [36]. Авторы окрашивали Е-РОК (лимфоциты) на α -нафтилацетатэстеразу и выявили, что 74,5 % АНАЭ+ лимфоцитов образовывали Е-роетки. Это еще раз подтвердило специфичность эстеразной активности для Т-лимфоцитов. Предполагается, что АНАЭ+ Е-РОК являются зрелыми Т-лимфоцитами. Указанное мнение согласуется со значительным снижением содержания Т-лимфоцитов с крупногранулярной реакцией на неспецифическую эстеразу и увеличением числа клеток с отрицательной реакцией у больных с различными формами злокачественных лимфопролиферативных заболеваний [13]. У больных хроническим лимфоцитарным лейкозом в крови преобладают АНАЭ-лимфоциты, что соответствует В-лимфоцитарной природе заболевания [12, 18, 24].

Еще одним ферментом, дающим об-

надеживающие результаты в идентификации Т- и В-популяций лимфоцитов, является кислая фосфатаза. Изучение лимфоидных клеток, полученных из периферической крови, лимфатических узлов, селезенки, миндалин и идентифицированных иммунологическими методами, показало четкое различие Т-, В- и «нуль»-лимфоцитов по характеру проявления реакции на кислую фосфатазу (см. таблицу). При этом, как и в реакции на неспецифическую эстеразу, Т-лимфоциты имеют единичные крупные гранулы с четкими краями, В-лимфоциты дают отрицательную реакцию, а «нуль»-лимфоциты содержат многочисленные мелкие гранулы на фоне диффузной окраски [6].

В последующем были предприняты попытки использовать цитохимические тесты для дифференциации субпопуляций Т-лимфоцитов. Так, по данным С. П. Сидоренко и соавт. [13], большая часть Т-лимфоцитов периферической крови и миндалин человека характеризуется положительной реакцией на

Различия популяций лимфоцитов в реакциях на неспецифическую эстеразу и кислую фосфатазу

Маркерный фермент	Т-лимфоциты	В-лимфоциты	«Нуль»-лимфоциты	Литературный источник
Кислая неспецифическая эстераза	+	—	+	[25]
	(крупное, компактное пятно)		(мелкие рассеянные гранулы)	
	+	—+	+	[13]
	(единичные крупные гранулы)	(мелкозернистая реакция)		
	+	—	—	[23]
	(крупные гранулы в Т _M -клетках и мелкие в Т _G -клетках)			
α -нафтилацетатэстераза	+	—	—	[19, 36, 39, 41]
	(крупная гранула)			
	+	—	—	[35]
	(крупные гранулы)			[30]
	+	—	+	[14]
	(крупная гранула)		(мелкие гранулы)	
α -нафтилбутиратэстераза	+	—	+	[14, 25]
	(крупная гранула)		(мелкие гранулы)	
Кислая фосфатаза	+	—	+	[6, 34]
	+	—+	—	[17, 19, 37]
	(высокая активность)	(низкая активность)		
	+	—+	—+	[13]
	(высокая активность, крупные гранулы)	(в части клеток реакция)	диффузная реакция	

кислую фосфатазу и неспецифическую эстеразу. При этом субпопуляции их различались по реакции на неспецифическую эстеразу. В Е-РОК с рецепторами к Fc_G и Е-РОК с рецепторами к СЗ-фрагменту комплемента реакция была мелкогранулярной, а для Е-РОК с рецепторами для Fc_M характерны единичные крупные гранулы продукта реакции. Аналогичные данные в отношении T_G - и T_M -лимфоцитов получены С. Grossi и соавт. [23]. При лейкозах и лимфомах выявлены изменения в соотношении различных фенотипических субпопуляций Т-лимфоцитов и активности кислой фосфатазы и неспецифической эстеразы [13]. Высокую активность кислой фосфатазы имеют Т-киллеры, находящиеся в контакте с клетками-мишенями [3].

Изучение Т-лимфоцитов периферической крови здоровых людей с помощью моноклональных антител и цитохимических методов на неспецифическую кислую эстеразу, α -нафтилацетатэстеразу, кислую фосфатазу и диаминопептидазу IV показало, что 80 % Т-клеток фенотипа $Leu-3a^+$ (хелперы/стимуляторы) давали положительную реакцию на эстеразы и 52,2 % этих клеток — на диаминопептидазу IV. Т-лимфоциты фенотипа $Leu-2a^+$ (супрессоры/цитотоксические) были положительными на эстеразы в 52,6 % случаев, а на диаминопептидазу IV — в 29,1 %. Обе субпопуляции Т-клеток не различались в реакции на кислую фосфатазу [26]. Несмотря на существенные различия в активности эстеразы и диаминопептидазы IV авторы не считают, что цитохимические тесты позволяют надежно дифференцировать Т-субпопуляции лимфоцитов. К аналогичному выводу пришли А. Facchini и соавт. [21], изучая различия в частоте встречаемости АНАЭ⁺-лимфоцитов среди ОКТ4⁺- и ОКТ8⁺-лимфоцитов, а также характер распределения эстеразной активности в этих клетках.

Таким образом, из вышеизложенного следует, что неспецифическая эстераза и кислая фосфатаза могут быть использованы для идентификации Т- и В-лимфоцитов в периферической крови здоровых людей и больных различными заболеваниями, а также у экспериментальных животных (см. таблицу).

В замороженных срезах лимфоидных образований (лимфатические узлы, миндалины, селезенка) людей и экспериментальных животных для этих целей может быть использовано определение активности неспецифической эстеразы [7, 11, 27, 32].

Противоречивость некоторых результатов и отсутствие иногда абсолютной четкости в возможности различать популяции лимфоцитов с помощью цитохимических реакций могут быть обусловлены, по нашему мнению, следующим: во-первых, неоднородностью популяции самих Т-лимфоцитов [16], а также сложным составом и нечеткой идентификацией «нуль»-клеток [10]; во-вторых, отсутствием стандартных методов цитохимических реакций на эстеразы и кислую фосфатазу, применяемых с этой целью. Использование различных фиксаторов, субстратов, длительность инкубации накладывают отпечаток на характер проявления конечных продуктов реакции на эти ферменты [12, 24].

Тем не менее цитохимические тесты идентификации популяций лимфоцитов привлекают все большее внимание. Вполне сопоставимые с данными иммунологических исследований результаты получены при обследовании здоровых и больных детей разного возраста [1, 2], а также взрослых людей [2, 5, 6]. Цитохимические тесты можно включить в комплекс лабораторных методов для характеристики лимфоцитов при различных заболеваниях. Их ценность заключается в простоте выполнения, экономии времени и малой травматичности для больного. Поэтому назрела необходимость внедрить их в клиническую практику как экспресс-методы для диагностики различных заболеваний. В связи с этим дальнейшие исследования должны быть направлены на выработку стандартных условий фиксации мазков крови, определение наиболее оптимальных субстратов и условий постановки самих реакций, опробование цитохимических тестов по стандартным методикам на больших возрастных группах людей в норме и при различных заболеваниях в сопоставлении с иммунологическими методами, поиск новых цитохимических тестов, пригодных для определения не только основных

групп лимфоцитов, но и их субпопуляций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бажора Ю. И., Буйко В. П. // Физиол. журн.— 1984.— Т. 30, № 1.— С. 96—101.
2. Боголовский В. М., Захарова Т. Р., Титова Н. С. и др. // Журн. микробиол.— 1985.— № 8.— С. 54—57.
3. Быковская С. Н., Комиссарова И. А., Кадагидзе Э. Г. // Бюл. экспер. биол.— 1975. Т. 80, № 7.— С. 64—67.
4. Глузман Д. Ф., Сидоренко С. П., Надгорная В. А. Цитохимия и иммунология лимфопрлиферативных заболеваний.— Киев, 1982.
5. Драгомирецкий В. Д., Бажора Ю. И., Гончар Л. Н., Николова М. Ц. // Журн. ушн., нос. и горл. бол.— 1982.— № 4.— С. 60—63.
6. Иванова Л. А., Васильева С. В., Соколов В. В. // Лаб. дело.— 1979.— № 10.— С. 593—595.
7. Канцевич Н. Н., Меркулова И. П., Зорин В. П. // Вопросы иммунологии.— Витебск, 1982.— С. 18.
8. Нарциссов Р. Л. // Вестн. АМН СССР.— 1978.— № 7.— С. 71—74.
9. Осин А. Я. // Лаб. дело.— 1984.— № 6.— С. 328—331.
10. Петров Р. В., Халатян Н. А., Манько В. М. // Успехи соврем. биол.— 1980.— Т. 90, № 2.— С. 193—210.
11. Пизгаревский П. В., Зельцер Г. Л. // Арх. пат.— 1982.— Т. 45, № 6.— С. 63—65.
12. Потапова С. Г., Шахбазян Г. П., Демидова Н. В., Козинец Г. И. // Лаб. дело.— 1981.— № 2.— С. 74—76.
13. Сидоренко С. П., Глузман Д. Ф., Уманский Ю. А. // Иммунология.— 1982.— № 1.— С. 49—53.
14. Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия: Пер. с англ.— М., 1983.
15. Цитохимия и электронная микроскопия клеток крови и кроветворных органов / Под ред. З. А. Бутенко.— Киев, 1974.
16. Чередыев А. Н. // Итоги науки и техники: Сер. Иммунология.— М., 1976.— Т. 4.— С. 124—160.
17. Barr R. D., Perry S. // Brit. J. Haemat.— 1976.— Vol. 32.— P. 565—572.
18. Barr R. D., Allardyce M. // Canad. med. Ass. J.— 1978.— Vol. 118.— P. 1279—1280.
19. Davey R. F., Huntington S. J., Macalum J., Macmath J. M. // J. clin. Path.— 1977.— Vol. 30.— P. 653—660.
20. Edelson R. L., Smith R. W., Frank M. M., Green J. // J. Invest. Derm.— 1973.— Vol. 61.— P. 82—94.
21. Facchini A., Mariani A. R., Papa S. et al. // Immunol. Lett.— 1984.— Vol. 8.— P. 207—210.
22. Fairbanks T. R. // J. Amer. med. Technol.— 1980.— Vol. 46.— P. 471—475.
23. Grossi C. S., Wedd S. R., Zieca A. et al. // J. exp. Med.— 1978.— Vol. 147.— P. 1405—1417.
24. Halper J. P., Tolidjian B., Knowles D. M. // Cell. Immunol.— 1982.— Vol. 72.— P. 367—374.
25. Higgy K. E., Burns G. F., Hayhoe F. G. J. // Scand. J. Haemat.— 1977.— Vol. 18.— P. 437—448.
26. Hirth A., Auner H. L., Wagner H. P. // Ibid.— 1984.— Vol. 32.— P. 190—194.
27. Houmark A. // Acta dermat.-venereol. (Stockh.).— 1977.— Vol. 57.— P. 497—502.
28. Knowles D. M., Hock S. // Lab. Invest.— 1978.— Vol. 39.— P. 70—76.
29. Knowles D. M., Hofman T., Ferrarini M., Kunkel H. G. // Cell. Immunol.— 1978.— Vol. 35.— P. 112—119.
30. Kulenkampff J., Janossy G., Greaves M. F. // Brit. J. Haemat.— 1977.— Vol. 36.— P. 231—240.
31. Lassila O., Alanen A. // Acta path. microbiol. immunol. scand.— 1982.— Vol. 90C.— P. 155—158.
32. Leprini A., Franzini A. T., Pallestrini E. A. // Nuovo Arch. ital. Otol. Rinol. Laring.— 1979.— Vol. 7.— P. 169—176.
33. Li C. Y., Yam K. W., Yam L. T. // J. Histochem. Cytochem.— 1973.— Vol. 21.— P. 1—12.
34. Lisiewicz J., Dobrowolski J., Bryniak C. // Folia haemat. (Lpz.).— 1976.— Bd 103.— S. 620—630.
35. Moretta L., Mingari M. C., Moretta A., Cooper M. D. // J. Immunol.— 1979.— Vol. 122.— P. 984—990.
36. Obrist R., Alrecht R., Nagel G. A. // Experientia.— 1978.— Vol. 34.— P. 660—661.
37. Pangalis G. A., Kuhl W., Waldman S. R. // Acta haemat. (Basel).— 1978.— Vol. 59.— P. 285—292.
38. Pangalis G. A., Waldman S. R., Rappoport H. // Amer. J. clin. Path.— 1978.— Vol. 69.— P. 314—318.
39. Ranki A., Totterman T. H., Hayry P. // Clin. exp. Immunol.— 1976.— Vol. 26.— P. 632—640.
40. Tanaka T. // Hiroshima J. med. Sci.— 1978.— Vol. 27.— P. 253—259.
41. Yang T. J., Jantzen P. A., Williams L. F. // Immunology.— 1979.— Vol. 38.— P. 85—93.

Поступила 19.11.85