

Определение сенсibilизации лейкоцитов по подавлению их прилипаемости под влиянием антигенов

П.Д. Новиков, В.И. Новикова, А.Д. Прокофьев

Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

Assessment of sensitization leukocyte in inhibition adhesion test

P.D. Novikov, V.I. Novikova, A.D. Prokofiev

Vitebsk state medical university, Vitebsk, Belarus

Аннотация

Для оценки специфического клеточного противобактериального иммунитета использована реакция подавления прилипаемости (адгезии) лейкоцитов антигенами. Под влиянием антигена сенсibilизированные лимфоциты выделяют фактор, угнетающий прилипание остальных лейкоцитов. Обследовано 36 детей и 14 взрослых больных гнойно-воспалительными заболеваниями, а также 12 здоровых детей. В разгар стафилококковой инфекции и при выздоровлении прилипаемость гранулоцитов значительно угнетали антигены стафилококка. Помимо стафилококкового, прилипаемость лейкоцитов угнетали другие бактериальные антигены, особенно в тех случаях, когда путем посевов материала выявлялись ассоциации микробов. Угнетение прилипаемости бактериальными антигенами ослабевало после выздоровления больных.

Ключевые слова

Реакция подавления прилипаемости лейкоцитов, сенсibilизация, бактериальные антигены

Для оценки специфического клеточного противобактериального иммунитета использована реакция подавления прилипаемости лейкоцитов антигенами [1]. Под влиянием антигена сенсibilизированные лимфоциты выделяют фактор, угнетающий прилипание остальных лейкоцитов. Поэтому механизм такой реакции близок к подавлению миграции лейкоцитов [1, 2]. Однако при добавлении больших доз антигенов к сенсibilизированным лейкоцитам возможно прямое повреждение пассивно сенсibilизированных гранулоцитов [2]. Существует несколько вариантов реакции: постановка в ге-

Summary

The leukocyte depressed adhesion test was used for evaluation of specific cell antibacteriological immunity. It has been tried in 36 children and 14 adults with purulently-inflammatory diseases and in 12 healthy children. Depression of adhesion test was under the influence of antigen of bacteria and became week after recovery.

Keywords

Test of leukocytes adhesion, sensitization, bacteriological antigens.

моцитометрах, в пробирках, в микроплатах. Ранее нами [1, 2] описан новый вариант этой реакции, характеризующейся высокой чувствительностью, простотой и стандартностью техники ее выполнения.

В настоящей работе разработаны принципы постановки реакции изменения прилипаемости лейкоцитов (РИПЛ) для выявления сенсibilизации к антигенам бактерий.

Материал и методы

Для постановки реакции приготавливали специальные стекла с лунками. На чистое обез-

жиренное стекло наклеивают перфорированную липкую ленту так, чтобы остался свободный участок до 2 см, используемый для подписи. Три ряда отверстий диаметром 5 мм по 5 в каждом ряду изготавливают пробойником диаметром 5-7 мм. После приклеивания перфорированной ленты на стекле образуются 3 ряда лунок. Однако лучше использовать специальные предметные стекла с тремя рядами лунок 0,5-0,7 см, применяемые для реакции иммунофлюоресценции (Flow Labs). В 1-й ряд лунок вносят по капле (0,02 мл) отмытых и разведенных в растворе Хенкса до концентрации 0,25 млн/мл лейкоцитов, добавив к ним равный объем растворителя антигенов (физиологическая среда). Во 2-й ряд вносят лейкоцитарную взвесь с добавлением одного антигена, а в 3-й ряд – взвесь с добавлением другого антигена или того же, но в иной концентрации. Стекла дублируют. Аналогично в лунки новых стекол вносят лейкоциты с другими антигенами. Реакцию можно ставить с цельной кровью. Для этого форменные элементы отмывают от плазмы и разводят так, чтобы в объеме, добавленном в лунку, содержалось около 500 лейкоцитов (одинаковое количество в каждой серии опытов). После инкубации во влажной камере при 37°C в течение 60 мин одно из двух стекол осторожно отмывают в растворе Хенкса, переворачивая его дном лунок вверх. Оба стекла помещают в пары формалина на 45 мин, затем высушивают, фиксируют в этаноле и красят по Романовскому. Прилипшие клетки считают в каждой лунке и находят среднее число лимфоцитов, гранулоцитов и всех лейкоцитов для каждого ряда лунок. Находят средний процент прилипших лейкоцитов в каждом ряду лунок отмытого стекла по сравнению с таковым на неотмытом и вычисляют показатель прилипаемости (ППЛ) в процентах:

$$\text{ППЛ} = \frac{\text{среднее число прилипших лейкоцитов}}{\text{среднее число добавленных лейкоцитов}} * 100$$

Одновременно вычисляют показатель изменения прилипаемости лейкоцитов (ПИПЛ) под влиянием антигенов для отмытых и неотмытых стекол (в процентах):

$$\text{ППЛ} = \frac{\text{среднее число лейкоцитов в лунках с антигенами}}{\text{среднее число лейкоцитов в лунках без антигенов}} * 100$$

Положительной считают такую реакцию, когда средний процент прилипших клеток (всех лейкоцитов, лимфоцитов или гранулоцитов в отдельности) с антигеном статистически достоверно меньше или больше, чем в реакции с кон-

трольным антигеном или без него. Если на неотмытом стекле с антигеном лейкоцитов тоже было меньше, чем без антигена, то антиген оказывал цитотоксическое влияние на лейкоциты, а не изменял их прилипаемость. Это доказано в опытах, в которых лейкоциты с такими антигенами инкубировали и окрашивали трипановым синим с эозином, при этом окрашивались погибшие лейкоциты, на которые антигены оказывали цитотоксическое воздействие.

Описанным методом было обследовано 36 детей, 14 взрослых, больных гнойно-воспалительными заболеваниями, а также 12 здоровых детей. Диагноз у больных ставили на основании клинических и лабораторных исследований. Этиологическая значимость микробов подтверждена посевами крови и другого материала. В качестве антигенов использовали бактериальные антигены-аллергены Казанского НИИ микробиологии (1 кожная доза в разведении 1:20), стафилококковый анатоксин, стрептолизин.

Результаты исследования и обсуждение

В начальный период заболевания бактериальные аллергены редко подавляли прилипаемость лейкоцитов. Только в разгар стафилококковой инфекции и при выздоровлении прилипаемость гранулоцитов значительно угнетали аллерген и анатоксин стафилококка (см. табл. 1). Помимо стафилококкового, прилипаемость лейкоцитов угнетали другие антигены, особенно в тех случаях, когда путем посевов материала выявлялись ассоциации микробов. Однако в целом антигены стафилококка и анатоксин, а также антигены стрептококка оказывали наибольшее влияние на прилипаемость лейкоцитов (см. табл. 1). Иногда некоторые антигены могли усиливать прилипаемость лейкоцитов, что, вероятно, указывало на слабую сенсibilизацию лейкоцитов [2]. Угнетение прилипаемости бактериальными аллергенами ослабевало после выздоровления больных (см. табл. 1). Полученные данные указывают на сенсibilизацию лейкоцитов при бактериальной инфекции и на ее изменение в динамике заболевания, что можно использовать с диагностической и прогностической целями.

Бактериальная сенсibilизация лейкоцитов – аллергия, выявлялась в реакции подавления миграции лейкоцитов при остром аппендиците [3], пневмониях [4], туберкулезе [5]. Угнетение прилипаемости лейкоцитов ан-

Таблица 1
Угнетение прилипаемости гранулоцитов больных с гнойно-воспалительными заболеваниями под влиянием бактериальных антигенов

Клиническая форма заболевания	Число наблюдений	% угнетения прилипаемости гранулоцитов аллергенами и антигенами					
		стаф. гемолитич.	стрептококка гемолитич.	протейя мирабилис	пневмококка группового	стаф. анатоксин	стрептолизин
Пневмонии (дети)	16	57±7,3	29±4,4	6±3,8	8±3,6	9±3,4	6±2,1
Пневмонии (взрослые)	14	44±4,4	40±6,7	9±2,1	39±2,4	16±2,2	8±2,4
Сепсис: септикопиемия	10	49±6,0	31±2,6	26±2,4	18±2,8	–	–
Сепсис: септицемия	10	29±3,3	20±2,8	15±3,4	15±3,6	–	–
После выздоровления	11	12±1,7	7±1,8	9±2,3	4±1,3	–	–
Здоровые дети	12	7±2,1	5±1,7	3±1,6	3±1,4	–	–

тигенами близкий по механизму, но более простой тест, позволяющий определить сенсibilизацию лейкоцитов к антигенам. Хотя ранее принято было считать [1], что именно лимфоциты выделяют фактор, угнетающий прилипание нейтрофилов, вполне вероятно, что инициировать этот процесс могут любые лейкоциты. Те же нейтрофилы могут связывать своими Fc-рецепторами антитела и ими

взаимодействовать с антигенами, выделяя цитокины и изменяя свою адгезию.

Вывод

1. Бактериальные аллергены и антигены угнетают прилипаемость лейкоцитов больных гнойно-воспалительными заболеваниями, что может иметь диагностическое и прогностическое значение.

Литература

1. Новиков Д.К., Новикова В.И. Реакция изменения прилипаемости лейкоцитов для оценки их сенсibilизации и адгезии. Лаб. дело. 1984; 6: 336-339.
2. Новиков Д.К., Новикова В.И. Оценка иммунного статуса. Москва-Витебск, 1996.
3. Новиков Д.К., Штурич П.И. Изучение бактериальной аллергии при остром аппендиците методом подавления миграции лейкоцитов *in vitro*. Вестник хирургии им. И.И.Грекова, 1976; 4: 51-55.
4. Новиков Д.К., Новикова В.И. Фактор, подавляющий миграцию лейкоцитов в сыворотке крови больных пневмониями как один из критериев перехода процесса в хронический. Педиатрия, 1978; 4: 19-22.
5. Новиков Д.К., Горбач А.Д., Горбач И.Н. Диагностическое значение фактора подавления миграции лейкоцитов в сыворотке крови больных туберкулезом легких. Проблемы туберкулеза, 1977; 8: 41-44.