

## ТЕСТ РОЗЕТКООБРАЗУЮЩИХ НЕЙТРОФИЛОВ В КЛИНИКЕ

Е. К. ОЛЕЙНИК, А. Х. ЛИВШИЦ, А. Г. БОРИСОВА

*Институт биологии Карельского филиала АН СССР*

В настоящее время метод розеткообразования находит все более широкое применение в клинической иммунологии. Метод позволяет идентифицировать субпопуляции иммунокомпетентных клеток и оценить их функциональное состояние. Недавно была обнаружена способность к спонтанному розеткообразованию с эритроцитами барана у нейтрофилов. Выявлена зависимость числа розеткообразующих нейтрофилов (Е-РОН) от стадии воспалительного процесса у больных хронической почечной недостаточностью [2]. Целью нашей работы явилось изучение популяции розеткообразующих лимфоцитов (Е-РОЛ) и розеткообразующих нейтрофилов у здоровых людей и у больных аутоиммунным расстройством.

### Материал и методы

Для исследований были взяты пробы крови у 34 здоровых доноров и 24 больных токсическим зобом. Кровь забирали из локтевой вены в количестве 5 мл в пробирки с гепарином (50 МЕ на 1 мл). Отстаивали при 37° С в течение 40—45 мин. Плазму, содержащую лейкоциты, наслаивали на градиент фиколл-верографина (плотность 1,075—1,079) из расчета 3 мл плазмы на 1 мл градиента. Центрифугировали взвесь клеток со скоростью 1500 об/мин. в течение 40 минут. В результате на границе плазмы и градиента собиралась популяция лимфоцитов, а на дне пробирки — нейтрофилы с примесью эритроцитов. Полученные фракции клеток использовали в реакции розеткообразования.

1. Постановка реакции розеткообразования нейтрофилов. В случае значительной примеси эритроцитов их предварительно удаляли осмотическим шоком, добавляя к осадку 2—3 капли дистиллированной воды и пипетируя его 15—20 сек. Затем добавляли избыток среды 199 и дважды отмывали клетки, центрифугируя в течение 5 мин. при 1000 об/мин. Готовили взвесь

нейтрофилов, содержащую  $5 \cdot 10^6$  клеток в 1 мл среды 199. Эритроциты барана трижды отмывали в физрастворе и готовили 0,4% взвесь в среде 199 ( $100 \cdot 10^6$  кл./мл).

К 0,5 мл взвеси нейтрофилов добавляли 0,5 мл взвеси эритроцитов барана, инкубировали при комнатной температуре 10 мин., а затем клетки осаждали 5 мин. при 1000 об/мин. и оставляли при  $4-6^\circ\text{C}$  на 18—24 часа. После окончания инкубации клетки фиксировали глутаральдегидом в конечной концентрации 0,6% в течение 20 мин. при комнатной температуре. Затем в пробирку добавляли избыток дистиллированной воды и клетки осаждали центрифугированием при 1000 об/мин. в течение 5 мин. Взвесь клеток тщательно ресуспендировали и наносили на предметное стекло. Препарат высушивали, фиксировали метанолом и окрашивали азур-эозином. Реакцию учитывали в световом микроскопе. Розеткой считалась клетка, связавшая не менее 3 эритроцитов. В окрашенном препарате определяли процент розеткообразующих нейтрофилов путем подсчета 200 клеток.

2. Постановка реакции розеткообразования лимфоцитов.

Лимфоциты собирали на границе между плазмой и градиентом, отмывали дважды в среде 199 при 1000 об/мин. в течение 5 мин. и разводили средой до концентрации  $2 \cdot 10^6$  клеток/мл. В конические стеклянные пробирки вносили 0,5 мл взвеси лимфоцитов и 0,5 мл 0,4% суспензии эритроцитов барана, приготовленных как описано выше. Смесь клеток инкубировали 5 мин. при  $37^\circ\text{C}$ , затем центрифугировали 5 мин. при 1000 об/мин. и помещали на 18—24 часа в холодильник при  $4-6^\circ\text{C}$ .

Фиксацию глутаральдегидом, окраску мазков и подсчет розеток проводили так же, как в реакции розеткообразования нейтрофилов.

## Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований показали, что большие характеризуются значительным отклонением от нормы как в нейтрофильном розеткообразовании, так и в лимфоцитарном.

Существенно подавляется число спонтанных розеткообразующих лимфоцитов ( $16,94 \pm 2,13$ ) по сравнению с контролем ( $31,31 \pm 2,38$ ). Активность нейтрофилов также значительно изменена:  $1,76 \pm 0,55$  у больных и  $10,31 \pm 1,02$  в контроле.

Угнетение розеткообразования происходит вследствие того, что блокируется часть антигенных рецепторов на поверхности клеток в результате повышенного уровня тиреоидных гормонов. С другой стороны, это может происходить в результате действия Т-супрессоров, число которых, по литературным данным, существенно возрастает при токсическом зобе [2].

Таким образом, проведенные исследования показали возможность использования реакции нейтрофильного розеткообразования для характеристики иммунологического статуса при аутоиммунных расстройствах. Сопоставление розеткообразования лимфоцитами и нейтрофилами показало, что аутоиммунный процесс оказывает аналогичное влияние на оба вида клеток, снижая их иммунологический потенциал. Но следует обратить внимание на значительное подавление нейтрофильного розеткообразования. Дальнейшее изучение этого показателя в зависимости от тяжести заболевания и стадии аутоиммунного процесса позволит выделить наиболее существенные моменты в возникновении аутоантигенов и развитии иммунологического конфликта в организме.

Метод розеткообразующих нейтрофилов может быть применен при других иммунодефицитных состояниях, когда необходимо оценить функциональное состояние иммунной системы. Неполноценность гранулоцитарного ряда возникает и в ходе терапии вследствие воздействия лекарственных препаратов, что следует иметь в виду при определении иммунологических показателей.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Держинская И. И. Розеткообразующая способность нейтрофилов и Т-лимфоцитов у больных хронической почечной недостаточностью.— Иммунология, 1982, № 1, с. 64—66.
2. Алешин Б. В., Губский В. И.\* Гипоталамус и щитовидная железа.— М.: Медицина, 1983.