

УДК: 576.5

*Влияние температурного фактора на спонтанное контактное взаимодействие лимфоцитов с гранулоцитами*

Евстропов Владимир Михайлович

*Аннотация:*

Выявлено действие температурного фактора на спонтанное контактное взаимодействие лимфоцитов с гранулоцитами. Установлено, что это межклеточное взаимодействие *in vitro* реализуется в виде трех различных типов, интенсивность проявления которых связана с температурными параметрами совместной инкубации данных клеток.

*Ключевые слова:* лимфоциты, гранулоциты, спонтанное контактное взаимодействие лимфоцитов с гранулоцитами, температурный фактор.

*The influence of temperature factor on spontaneous contact interaction of lymphocytes with granulocytes*

Evstropov Vladimir Mihaylovich

*Abstract:*

Revealed the effect of temperature factor on spontaneous contact interaction of lymphocytes with granulocytes. It is established that this cellular interaction *in vitro* is implemented in the form of three different types, the intensity of which is related to the temperature parameters of the joint incubation of these cells.

*Keywords:* lymphocytes, granulocytes, spontaneous contact interaction of lymphocytes with granulocytes, the temperature factor

## **Введение**

При обосновании целесообразности изучения спонтанного контактного взаимодействия лимфоцитов с гранулоцитами мы исходили из гипотетической возможности кооперации лимфоцитов, обладающих антигенраспознающей способностью, с гранулоцитами, прежде всего нейтрофилами, реализующими эффекторную фагоцитарную (антиген-утилизирующую) функцию, но не способных определять идентифицировать степень чужеродность антигена в соответствии со спецификой его генетически детерминированной конструкции [8].

Сама идея разработки данного метода возникла в процессе изучения антигенсвязывающих лимфоцитов при остром инфаркте миокарда [6]. В частности, был разработан способ приготовления клеточной взвеси на стекле [2], принципиальной особенностью которого стала

возможность более точного учета лимфоцитов, контактирующих между собой путем посредством связывания молекулы антигена антигенспецифическими рецепторами этих клеток. Преимущество данного способа заключалось в использовании при приготовлении клеточной взвеси жидких питательных сред, предварительно нанесенных на стекло. Это создавало более оптимальные цитофизиологические условия в процессе приготовления препарата и повышало точность результирующей оценки, за счет уменьшения механического (физического) артефакта при контактировании клеточных агглютинатов (агломератов) с поверхностью стекла.

Прототипом метода определения спонтанного контактного взаимодействия лимфоцитов с гранулоцитами (лимфоцитарно-гранулоцитарное взаимодействие) стало исследование нами спонтанной (неспецифический тест агломерации лейкоцитов) и аллергической (специфической – с миоглобином) агломерации лейкоцитов в мазках крови больных инфарктом миокарда [1,5].

Однако очевидно, что при постановке реакции лейкоцитов лейкоциты инкубируются в присутствии аутоплазмы крови, которая может содержать иммуно-активные биомолекулы (антигены и аутоантигены, циркулирующие иммуноглобулины, аутоантитела, интерферон, интерлейкины и др.) или комплексы биомолекул (циркулирующие иммунные комплексы, белки системы комплемента и т.д.) [8]. В связи с этим, по нашему мнению, для минимизации влияния иммуно-активных биомолекул, а также эритроцитов, затрудняющих вследствие своей многочисленности в крови возможность контактного взаимодействия тестируемых клеток, необходимо изучать спонтанное контактное взаимодействие лимфоцитов с гранулоцитами после их выделения из крови и введения *in vitro* в искусственную систему лимфоцит – гранулоциты.

Следует отметить, что исследования контактного взаимодействия лимфоцитов с гранулоцитами начали проводиться нами еще в восьмидесятых – девяностых годах XX века, когда на базе Киргизского НИИ эпидемиологии, микробиологии и гигиены (впоследствии НИИ профилактики и медицинской экологии Минздрава республики Кыргызстан) были проведены серии экспериментов в данном направлении с клетками иммунной системы человека, интактных и иммунизированных животных (крыс, мышей). Изучались различные аспекты взаимодействия клеток иммунной системы, в частности, влияние на него митогенов и антигенов, ионов кальция, особенности фагоцитоза и др. Однако полученные результаты были опубликованы лишь частично [3,4], в силу

потенциальной патентоспособности значительной части полученных результатов.

## **Цель исследования**

Цель данной работы заключалась в оценке влияния условий инкубации *in vitro* на интенсивность спонтанного контактного взаимодействия лимфоцитов с гранулоцитами и обсуждении полученных результатов в контексте дальнейшего их эмпирического использования

## **Материал и методы**

Для исследования использовали гепаринизированную кровь 12 доноров (практически здоровых лиц). В работе применяли силиконированные пробирки и стеклянные пипетки. Их, а также жидкие питательные среды и используемые растворы, применяли охлажденными до 4<sup>0</sup> С, для предотвращения активации нейтрофилов. Кровь осторожно наслаивали на двойной градиент фиколла-верографина с удельной плотностью 1.077 и 1.119 г/см<sup>3</sup>, затем центрифугировали при 400 g в течение 45 мин. После центрифугирования аккуратно отбирали моноклеарные клетки из верхнего кольца и гранулоциты – из нижнего кольца. Клетки трижды отмывали в среде 199, центрифугируя 10 мин при 200 g. Фракцию моноклеарных клеток, для удаления моноцитов, инкубировали 1 час в бакпечатках однократного применения в среде 199 при 37<sup>0</sup> С. Параллельно готовили монослой гранулоцитов на покровном стекле, помещенном в другую бакпечатку, инкубируя на нем взвесь гранулоцитов (9 x 10<sup>6</sup>/мл) в среде 199 в течение 1 часа при 37<sup>0</sup> С. Затем с покровного стекла удаляли использованную среду 199, заменяли ее отмытыми лимфоцитами в среде 199, полученными из фракции моноклеарных клеток (4 x 10<sup>6</sup>/мл), и инкубировали в течение 1 часа при различной температуре: приближенной к комнатной (20<sup>0</sup> С), пониженной (4<sup>0</sup> С) и повышенной (37<sup>0</sup> С). После инкубации препарат фиксировали глутаровым альдегидом, высушивали, фиксировали этиловым спиртом и окрашивали по Романовскому-Гимза в течение 45 минут. В световом микроскопе под иммерсией регистрировали 100 лимфоцитов и определяли процент этих клеток с присоединившимися к их поверхности гранулоцитами. Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

## Результаты исследования и их обсуждение

Спонтанное контактное взаимодействие лимфоцитов с гранулоцитами (СКГЛ) наблюдалось при всех изучаемых температурных параметрах совместного инкубирования клеток. При этом регистрировались три различных типа этого взаимодействия: 1) СКНГЛ – взаимодействие лимфоцита с одним гранулоцитом (низко-гранулоцитотропные лимфоциты); СКСГЛ – взаимодействие лимфоцита с двумя гранулоцитами (средне-гранулоцитотропные лимфоциты); СКВГЛ – взаимодействие лимфоцита с тремя и более гранулоцитами (высоко-гранулоцитотропные лимфоциты) (Табл. 1).

Таблица 1

*Влияние температуры на интенсивность спонтанного контактного взаимодействия лимфоцитов с гранулоцитами (%)*

Температура (°С)	Свободно лежащие лимфоциты	СКГЛ	СКНГЛ	СКСГЛ	СКВГЛ
37	53,5 ± 0,7	46,5 ± 0,7	26,1 ± 0,8**	13,0 ± 0,5	7,5 ± 0,8**
20	46,5 ± 0,8	53,5 ± 0,8**	30,3 ± 0,8	17,8 ± 0,8**	5,4 ± 0,4
4	50,6 ± 0,9	49,4 ± 0,9	33,0 ± 0,9	12,6 ± 0,6	4,8 ± 0,4

Примечание: \*\* – статистически достоверное различие от показателя, отражающего данный тип спонтанного контактного взаимодействия лимфоцитов с гранулоцитами при других температурных условиях инкубации клеток.

Наиболее интенсивное спонтанное контактное взаимодействие лимфоцитов с гранулоцитами (СКГЛ) наблюдалось при температуре 20° С. Эта закономерность была присуща и для СКСГЛ. А вот другие типы контактного взаимодействия лимфоцитов с гранулоцитами (СКВГЛ) чаще регистрировались при повышенной температуре (37° С), либо (СКНГЛ) при пониженной температуре.

Эта закономерность свидетельствует в пользу того, что спонтанное контактное взаимодействие лимфоцитов с гранулоцитами *in vitro* может отражать различие в функциональных или морфофункциональных фенотипических признаках исследуемых клеток.

При кратковременном действии высокой внешней температуры *in vivo* (в течение двух часов при температуре 38° С) [Надеждин и др.] наблюдается несколько иная картина. Авторы заключают, что при

действии данной температуры в качестве тенденции появляется повышение адгезионных свойств нейтрофилов. Исходя из данных [7], можно думать, о том, что возрастание числа СКВГЛ в процессе инкубации изучаемых нами клеток при повышенной температуре отражает повышение адгезионных свойств нейтрофилов, возможно, и лимфоцитов.

Известно, что к одной из общих характеристик молекул адгезии относится их способность экспрессироваться на различных типах клеток иммунной системы (субпопуляции лимфоцитов, нейтрофилы, естественные киллеры и т.д.) [9]. В частности, с цитомембраной нейтрофилов связаны молекулы адгезии  $\beta 2$  – интегрины (LFA-1, Mac-1, p150, 95) и L- селектин, с мембраной лимфоцитов – LFA-1 [10].

С нашей точки зрения особенности спонтанного контактного взаимодействия лимфоцитов с гранулоцитами проистекают вследствие того, что: 1) исходные клетки, до их совместного инкубирования, освобождаются от плазмы крови, а следовательно и от присутствующих в плазме крови биомолекул (антигенов и аутоантигенов, антител, аутоантител, циркулирующих иммунных комплексов, комплемента и др.), которые способны прямо или косвенно влиять на контактное взаимодействие данных клеток, взаимодействуя с соответствующими рецепторами их цитомембран; 2) инкубирование взаимодействующих клеток осуществляется на достаточно большой горизонтальной поверхности подложки, а не на локально- ограниченном дне центрифужной пробирки, что позволяет высококомобильным нейтрофилам реализовывать естественный цитокин-ориентированный маршрут.

## **Выводы**

1. Лимфоциты контактно взаимодействуют с гранулоцитами при различных температурах инкубации.
2. Спонтанное контактное взаимодействие лимфоцитов с гранулоцитами *in vitro* реализуется в виде трех различных типов этого взаимодействия, интенсивность проявления которых связана с температурными параметрами совместной инкубации данных клеток.

## **Список литературы**

1. Евстропов В.М. Клеточные иммунологические реакции с миоглобином и актомиозином при инфаркте миокарда. Первый съезд кардиологов Украинской ССР: Тезисы докладов. – Киев. – 1978. – С.61.

Евстропов В. М., Влияние температурного фактора на спонтанное контактное взаимодействие лимфоцитов с гранулоцитами // «Живые и биокосные системы». – 2016. – № 15; URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-15/article-5>

2. Евстропов В.М. Приготовление клеточной взвеси на стекле // Лабораторное дело. – 1983. – №.2. – С 54.
3. Евстропов В.М., Сорокина Н.А. Некоторые закономерности физического антигеннезависимого взаимодействия лимфоцитов с гранулоцитами крови человека // Окружающая среда и здоровье человека: Труды НИИ профилактики и медицинской экологии.
4. Евстропов В.М., Степко И.Н., Сорокина Н.А. Феномен физического антигеннезависимого взаимодействия лимфоцитов с гранулоцитами // Окружающая среда и здоровье человека: Труды НИИ профилактики и медицинской экологии. – Бишкек. – 1993. – Т.1. – С.157 – 162. – Бишкек. – 1993. – Т.1. – С. 152 – 156.
5. Китаев М.И., Евстропов В.М., Клейменов В.Н. Лимфоцитарно-гранулоцитарное взаимодействие в феномене аллергической агломерации аллергенолейкергии у больных инфарктом миокарда // Здравоохранение Киргизии. – 1986. – №.1. – С.43 – 45.
6. Миррахимов М.М. Антигенсвязывающие лимфоциты при остром инфаркте миокарда / М.М. Миррахимов, М.И. Китаев, Б.Н. Тюробаева, В.М. Евстропов // Кардиология. – 1981. – №.1. – С.12 – 15.
7. Надеждин С.В. Изменения функциональной активности лейкоцитов в условиях острого перегревания организма / С. В. Надеждин, М. З. Федорова, Н. А. Павлов, Е. В. Зубарева. // Научные ведомости. – 2008. – №. 3. – С.5 – 11.
8. Ройт А. Основы иммунологии / Пер. с англ. Т.В.Великодворской, Т.Н.Власик, А.А.Нейфаха. – М.: Мир. 1991. – 328 с.
9. Тотолян А.А., Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы. – СПб.: Наука, 2000. – 231 с.
10. Ярилина А.А. Роль молекул адгезии в патогенезе ревматоидного артрита // Научно-практическая ревматология. – №. 1. – 2000. – С.61 – 69.

### **Spisok literaturyi**

1. Evstropov V.M. Kletochnyie immunologicheskie reaktsii s mioglobinom i aktomiozinom pri infarkte miokarda. Pervyyiy s'ezd kardiologov Ukrainskoy SSR: Tezisyi dokladov. – Kiev. – 1978. – S.61.
2. Evstropov V.M. Prigotovlenie kletochnoy vzvesi na stekle // Laboratornoe delo. – 1983. – #.2. – S 54.

3. Evstropov V.M., Sorokina N.A. Nekotoryie zakonomernosti fizicheskogo antigennezavisimogo vzaimodeystviya limfotsitov s granulotsitami krovi cheloveka // Okruzhayushchaya sreda i zdorove cheloveka: Trudyi NII profilaktiki i meditsinskoy ekologii.
4. Evstropov V.M., Stepko I.N., Sorokina N.A. Fenomen fizicheskogo antigennezavisimogo vzaimodeystviya limfotsitov s granulotsitami // Okruzhayushchaya sreda i zdorove cheloveka: Trudyi NII profilaktiki i meditsinskoy ekologii. – Bishkek. – 1993. – T.1. – S.157 – 162. – Bishkek. – 1993. – T.1. – S. 152 – 156.
5. Kitaev M.I., Evstropov V.M., Kleymenov V.N. Limfotsitarno-granulotsitarnoe vzaimodeystvie v fenomene allergicheskoy aglomeratsii allergenoleykergii u bolnyih infarktom miokarda // Zdravoohranenie Kirgizii. – 1986. – #.1. – S.43 – 45.
6. Mirrahimov M.M. Antigensvyazyivayushchie limfotsityi pri ostrom infarkte miokarda / M.M. Mirrahimov, M.I. Kitaev, B.N. Tyurebaeva, V.M. Evstropov // Kardiologiya. – 1981. – #.1. – S.12 – 15.
7. Nadezhdin S.V. Izmeneniya funktsionalnoy aktivnosti leykotsitov v usloviyah ostrogo peregrevaniya organizma / S. V. Nadezhdin, M. Z. Fedorova, N. A. Pavlov, E. V. Zubareva. // Nauchnyie vedomosti. – 2008. – #. 3. – S.5 – 11.
8. Royt A. Osnovy immunologii / Per. s angl. T.V.Velikodvorskoy, T.N.Vlasik, A.A.Neyfaha. – M.: Mir. 1991. – 328 s.
9. Totolyan A.A., Freydlin I.S. Kletki immunnoy sistemyi. – SPb.: Nauka, 2000. – 231 s.
10. Yarilina A.A. Rol molekul adgezii v patogeneze revmatoidnogo artrita // Nauchno-prakticheskaya revmatologiya. – #. 1. – 2000. – S.61 – 69.