

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Миокард* при острой и хронической алкогольной интоксикации в эксперименте / Беляева Н. Ю., Пауков Н. С., Свистухин А. И. и др. // *Арх. патологии.*— 1982.— 44, № 8.— С. 25—32.
2. *Непомнящих Л. М.* Патологическая анатомия и ультраструктура сердца.— Новосибирск: Наука, 1981.— 321 с.
3. *Петрик Ю. С.* Влияние иммунодепрессантов на течение экспериментального инфаркта миокарда // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической иммунологии.— Воронеж, 1976.— С. 82—84.
4. *Рапопорт Я. Л., Князева Г. Д., Державец Л. Х.* Гистохимическая характеристика миокарда в ранние сроки экспериментальной ишемии и постишемическом периоде // *Груд. хирургия.*— 1963.— № 6.— С. 52—55.
5. *Рутберг Р. Н.* Простой и быстрый метод одновременного определения скорости рекальцификации и фибрина крови // *Лаб. дело.*— 1968.— № 6.— С. 6—8.
6. *Семенов Е. П., Семенова Л. А., Целлариус Ю. Г.* Аутоиммунные реакции при экспериментальных некробиотических повреждениях миокарда // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.*— 1969.— 82.— С. 20—23.
7. *Таракулов Я. Х., Кургульцев Л. И., Гогельганц А. И.* Метод определения неорганического фосфора в биологических объектах // *Биохимия.*— 1967.— 32, № 4.— С. 106—109.
8. *Ямицков Н. В.* Репарация миокарда эмбрионов кур после воздействия циклофосфана // *Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии.*— 1983.— 34, № 3.— С. 41—44.
9. *Boyden S.* Passive hemagglutination in study of antigens and antibodies // *Methods in medical research.*— 1964.— 10.— P. 152—153.
10. *Hungerford D., Donnell T., Beck S.* The chromosome constitution of a human. Phenotypic intesek // *Human Genetic.*— 1950.— 11.— P. 215—236.
11. *Kowalski E., Kafok M., Nawiarowsky S.* An evolution of euglobulin method for the determination of fibrinolysis // *J. Clin. Pathol.*— 1959.— 12.— P. 215—218.
12. *Lee P., White P.* Clinical study of the coagulation time of blood // *Amer. J. Med. Sci.*— 1913.— 145.— P. 455—503.
13. *Middelbrock G., Dubos P.* Specific serum agglutination of erythrocytes sensitised with extract of tubercles bacilli // *J. Exp. Med.*— 1948.— 88.— P. 6—6.
14. *Pears A.* Гистохимия.— М.: Изд-во иностр. лит.— 1962.— С. 962.
15. *Sigg B.* Der Heparintoleranztest. Eine Methode zur Beurteilung der Gerinnungstätigkeit des Blutes / Schweiz. med. Wschr.— 1952.— 80.— S. 284—287.
16. *Fiske A., Jobberow H.* Цит. по Асатиани В. С. Биохимическая фотометрия.— 1957.— С. 95—97.

Одес. мед. ин-т им. Н. И. Пирогова
М-ва здравоохранения УССР

Материал поступил в редакцию 17.02.89

УДК 616.61—089.843—097

Г. Н. Дранник, Е. Я. Баран, О. Ф. Сенюк, В. Е. Дриянская

Антителозависимая и спонтанная цитотоксичность лимфоцитов периферической крови реципиентов и клеток, инфильтрировавших почечный аллотрансплантат

Большое внимание, уделяемое в настоящее время изучению клеток киллеров (К-клеток) и клеток естественных киллеров (ЕК-клеток), которые реализуют феномены антителозависимой и спонтанной клеточно опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ и СКЦ соответственно), объясняется тем, что именно эти эффекторы формируют первую линию защиты млекопитающих от возбудителей инфекции и, особенно, вирусинфицированных и малигнизированных клеток [5]. Относительно же вклада их в патогенез отторжения почечного аллотрансплантата и возможности на основании АЗКЦ и СКЦ ставить диагноз криза отторжения единого мнения в литературе пока не существует. Результаты исследований порой противоположны: по данным одних авторов [4, 12], с помощью АЗКЦ и СКЦ можно предсказать развитие криза, по данным других [2, 6, 10, 11] — нет.

Цель нашей работы — установить взаимосвязь показателей АЗКЦ и СКЦ в периферической крови и инфильтратах почечных аллотрансплантатов и показателей функции пересаженной почки, а также определить роль К- и ЕК-клеток в аллотрансплантации.

Методика

Проанализированы АЗКЦ и СКЦ у 35 практически здоровых людей, 56 больных хронической почечной недостаточностью (терминальная стадия), леченных гемодиализом, и 42 реципиентов почечных аллотрансплантатов (ПА).

Значение показателей АЗКЦ и СКЦ у реципиентов определяли непосредственно перед операцией, на следующие сутки после операции и далее 2 раза в неделю. Диагностику криза отторжения основывали на совокупности значений клинических, функциональных и иммунологических показателей. Во всех случаях необратимой острой реакции отторжения почки диагноз подтверждался морфологически.

Мононуклеары получали из венозной гепаринизированной крови и из ткани удаленных аллотрансплантатов в стандартном (1,076—1,078) градиенте плотности фикоколл—верографин. Для получения суспензии клеток, инфильтрировавших вещество удаленной почки, ткань измельчали до получения частиц диаметром 2—3 мм и тщательно отмывали от крови средой 199. В течение 20 мин ткань инкубировали в 0,1 %-ном растворе трипсина при температуре 37 °С, после чего для инактивации фермента добавляли избыток сыворотки крупного рогатого скота. Затем взвесь измельченной ткани ресуспендировали в среде 199 и на протяжении 20—30 мин на магнитной мешалке получали суспензию клеток.

СКЦ определяли с помощью метода, описанного Зарецкой [1]. В качестве клеток-мишеней использовали клетки (3—5 млн в 1 мл инкубационной среды) перевиваемой миелоидной линии К-562, которые предварительно метили ^{51}Cr (100 мкКи/мл). Соотношение мононуклеаров и клеток-мишеней составляло 25:1. АЗКЦ определяли аналогичным способом, используя при этом кроличью антисыворотку против клеток миелоидной линии К-562 в субагглютинирующем титре (1:10). Для получения максимального цитолиза использовали 3 %-ный раствор ЭДТА. Учет спонтанного цитолиза осуществляли в пробах с культуральной средой.

Тест-системы культивировали в течение 14 ч при температуре 37 °С, после чего центрифугировали 15 мин при 100 мин⁻¹ и определяли относительную активность (%) 0,1 мл надосадочной жидкости на установке «ГАММА-1».

$$\text{СКЦ, АЗКЦ} = \frac{\text{опыт (СКЦ, АЗКЦ)} - \text{контроль спонтанного цитолиза}}{\text{максимальный цитолиз} - \text{контроль спонтанного цитолиза}} \cdot 100 \%$$

Результаты обрабатывали статистически с использованием критерия *t* Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Анализ полученных результатов показал, что функциональная активность К- и ЕК-клеток у здоровых людей в среднем составляла $17,2 \pm 3,9$ и $14,2 \pm 4,2$ соответственно (рис. 1). Результаты исследования АЗКЦ и СКЦ у больных, находящихся на лечении программным гемодиализом (см. рис. 1), подтвердили имеющиеся в литературе сообщения [2, 10] о существенном снижении значений этих показателей по сравнению с таковыми практически здоровых людей. Это снижение можно объяснить наличием в сыворотке крови больных уремией диализируемых и недиализируемых иммуносупрессивных факторов [3], а также иммунных комплексов. Сразу же после пересадки и иммуносупрессивной терапии (введение преднизолона и азатиоприна) значения относительных АЗКЦ и СКЦ еще больше снижались и перед кризом не повышались, как это удалось выявить некоторым исследователям. В то же время в разгар криза отторжения регистрировали подъем функциональной активности К- и ЕК-клеток (см. рис. 1). В случае эффективности иммуносупрессивной терапии и обратного развития острой реакции отторжения наблюдалось постепенное снижение значений этих показателей до предкризового состояния.

У реципиентов с функционирующим более года ПА значения АЗКЦ и СКЦ достоверно не отличались от таковых у больных, леченных программным гемодиализом (см. рис. 1). Эти результаты можно рассматривать как обнадеживающие в плане такого серьезного осложнения длительной иммуносупрессивной терапии, как развитие новообразований, частота появления которых у этой категории больных высока [8, 9].

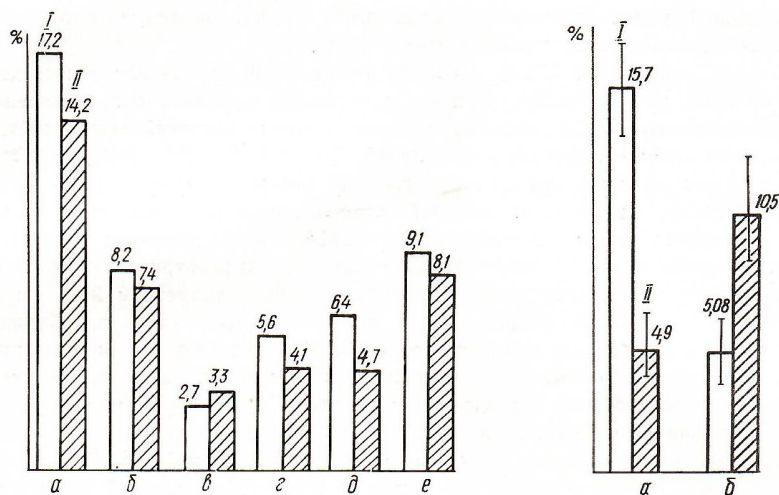


Рис. 1. Антителозависимая (I) и спонтанная (II) клеточно опосредованная цитотоксичность (% максимального цитолиза) у здоровых людей (a), у больных хронической почечной недостаточностью, леченных гемодиализом (б), на 1—11-е сутки после пересадки почки (в), в период криза (г), в спокойный период функционирования почечных аллотрансплантатов (д) и у долгожителей (е).

Рис. 2. Посттрансплантационный период в зависимости от диссоциации антителозависимой (I) и спонтанной (II) клеточно опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ и СКЦ соответственно, % максимального цитолиза) до пересадки:

a — дооперационное повышение АЗКЦ — ранняя необратимая реакция отторжения у 81 % больных; б — дооперационное снижение АЗКЦ — ранняя необратимая реакция отторжения у 20 % больных.

С целью оценки информативности определения относительной АЗКЦ и СКЦ для диагностики криза отторжения был проведен индивидуальный анализ (рис. 2). Число всех кризов, зарегистрированных у больных, было принято за 100 %. Оказалось, что до криза повышение значений АЗКЦ было отмечено лишь в 20 % случаев, а повышение значений СКЦ — в 10 %. В разгар криза, несмотря на большие дозы иммуносупрессии, частота повышения значений АЗКЦ и СКЦ резко возрастала — до 70 и 40 % соответственно. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что для предсказания острого криза отторжения определение относительных АЗКЦ и СКЦ неинформативно.

Вместе с тем резкое увеличение значений этих показателей, в том числе и на фоне ударных доз иммуносупрессии, позволяет предположить, что К- и ЕК-клетки принимают участие в патогенезе ПА.

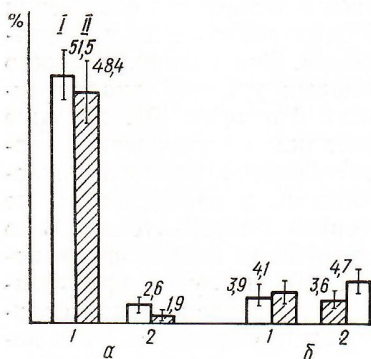


Рис. 3. Антителозависимая (I) и спонтанная (II) клеточно опосредованная цитотоксичность клеток, инфильтрировавших почечный аллотрансплантат (1), и клеток периферической крови (2) в группах реципиентов, переживающих некупированные острые кризы отторжения (a) и с удовлетворительно функционирующими почечными аллотрансплантатами (б).

Индивидуальный анализ выявил интересную особенность. В 11 случаях до пересадки у больных была обнаружена диссоциация АЗКЦ и СКЦ: в 6 случаях отмечены повышение значений АЗКЦ и снижение значений СКЦ, а в 5 — наоборот, снижение значений АЗКЦ и почти нормальные значения СКЦ. При анализе особенностей послеоперационного периода оказалось, что у 5 из 6 больных с повышенной относительной АЗКЦ до операции развивалась ранняя необратимая реакция отторжения. Напротив, в случае низкой дооперационной относительной АЗКЦ необратимый криз отторжения развивался лишь в одном случае из пяти. Таким образом, клиницистов подобная диссоциация активности К- и ЕК-клеток должна настораживать в плане прогноза раннего развития острой реакции отторжения пересаженной почки.

Для более достоверного суждения об участии или неучастии К- и ЕК-клеток в патогенезе острой реакции отторжения пересаженной почки было проведено следующее исследование. Из 22 ПА, удаленных по тем или иным причинам, с помощью ферментативной обработки ткани почки получены клетки, инфильтровавшие ПА. Параллельно в стандартном градиенте плотности фикола — верографина выделяли пул мононуклеарных клеток из периферической крови. Полученные почечные трансплантаты разделили на две группы: А — удаленные по поводу некупируемого криза отторжения (15 органов) и В — удаленные по причинам, не связанным с иммунологическим кризом отторжения (7 органов).

Результаты сравнения АЗКЦ- и СКЦ-клеток, полученных из пересаженных почек и периферической крови реципиентов, показали (рис. 3) следующее: в группе А значения относительных АЗКЦ и СКЦ инфильтрата были в несколько раз выше по сравнению с таковыми этих показателей периферической крови. В то же время в группе В подобной диссоциации не наблюдали — значения АЗКЦ и СКЦ относительных клеток инфильтрата и периферической крови достоверно не отличались. Эти результаты позволяют с немалой долей вероятности утверждать, что К- и ЕК-клетки участвуют в патогенезе острой реакции отторжения. Тем более, что в литературе имеются данные [7] о том, что ЕК-клетки не просто вовлекаются в отторжение аллогенного органа, а заселяют его даже раньше, чем специфические цитотоксические Т-лимфоциты.

Выводы

1. Определение относительных АЗКЦ и СКЦ в периферической крови неинформативно для ранней диагностики развивающегося острого криза отторжения.

2. Наблюдается повышение активности К- и ЕК-клеток в периферической крови в период разгара острого криза отторжения.

3. При исследовании клеточного инфильтрата, полученного из почечного аллотрансплантата, отмечается значительное повышение активности К- и ЕК-клеток в отторгающихся трансплантатах, что может указывать на их роль в потере функции пересаженной почки.

4. Повышение относительной АЗКЦ и снижение относительной СКЦ до пересадки (диссоциация активности) должны настораживать в плане прогноза раннего развития острой реакции отторжения.

ANTIBODY-DEPENDENT AND SPONTANEOUS CYTOTOXICITY OF THE PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN RECIPIENTS AND CELLS INFILTRATING RENAL ALLOTRANSPLANT

G. N. Drannik, E. Ya. Baran, O. F. Senyuk, V. E. Driyanskaya

It is supposed that determination of antibody-dependent cellular-mediated cytotoxicity and spontaneous cellular-mediated cytotoxicity in the peripheral blood is noninformative for early diagnosis of acute rejection crisis. Activity of К- and NK-cells in peripheral