

NIEKTÓRE ASPEKTY IMMUNOLOGICZNE UCZULENIA I REAKCJI TUBERKULINOWEJ

Ludwik Rzucidło

Zakład Immunologii i Szczepień Ochronnych Instytutu Gruźlicy w Warszawie

Kierownik: prof. dr L. Rzucidło

Istota, mechanizm powstawania i znaczenie uczulenia tuberkulinowego dla odporności przeciwgruźliczej są w ostatnich latach przedmiotem dość licznych badań doświadczalnych na zwierzętach i człowieku. Ponowna fala tych badań wiąże się z tym, że w ostatnich dwóch dziesiątkach lat rozwinęła się nowa gałąź immunologii a mianowicie cytoimmunologia, zajmująca się immunologicznymi procesami rozgrywającymi się na poziomie komórki a nawet na poziomie subkultur komórkowych.

W początkach swego istnienia próba tuberkulinowa wykrywała prawie wyłącznie istniejący lub przebyty kontakt z prątkiem gruźlicy. Ale w ciągu ostatnich lat wartość jej w diagnostyce znacznie zmalała albowiem uczulenie tuberkulinowe jest obecnie nie tylko następstwem zakażenia wirulentnymi prątkami gruźlicy lecz również prątkami atypowymi, a przede wszystkim szczepieniem BCG. Ta ostatnia okoliczność nabrała szczególnego znaczenia w krajach, w których szczepienie BCG jest obowiązkowe i wykonywane masowo.

Reakcja tuberkulinowa jest wtórną reakcją immunologiczną na antygeny białkowe prątka. Procesy immunologiczne indukowane pierwszym kontaktem z prątkiem nazwiemy przeto pierwotną odpowiedzią immunologiczną. Nie jest ona jednorodna, składa się bowiem z alergii komórkowej i odporności przeciwgruźliczej w przypadku szczepienia żywą szczepionką BCG.

Prątek jako antygen indukuje uczulenie komórkowe na białka zwane tuberkuloproteinami. Same białka prątka jako antygen nie powodowałyby tego rodzaju uczulenia. Następstwem immunizowania nimi zwierząt doświadczalnych są przeciwciała antytuberkulo-proteinowe w krwiobiegu. Przeto białka te podobnie jak inne białka są w stanie wywołać reakcję humoralną i ewentualnie stany nadwrażliwości związanej z tymi przeciwciałami. Dopiero w obecności niektórych substancji lipidowych ko-

mórki prątka, białka stają się antygenem indukującym uczulenie tuberkulinowe, oparte na istnieniu uczulonych komórek, bez współdziałania czynników humoralnych a przede wszystkim swoistych antytuberkuloproteinowych przeciwciał. Do czynników determinujących alergiczność białek prątka bezsprzecznie należą niektóre odmiany wosku *D*. Tylko odmiana lub frakcja tego wosku, w skład której poza wielocukrowcem grupowo-swoistym, jako antygen, i kwasami mykolowymi — wchodzi również siedmiopeptyd zbudowany z trzech reszt alaniny, dwóch reszt kwasu *D*-glutaminowego i dwóch reszt kwasu mezo-dwu-aminopimelinowego. Woski *D* nie posiadające takiego siedmiopeptydu a zawierające peptyd zbudowany z innych aminokwasów a często z większej ich różnorodności oraz woski *D* nie posiadające peptydu nie posiadają właściwości sterowania antygenami białkowymi prątka. Prątki BCG, podobnie jak wirulentne prątki bydłce, nie posiadają wosku *D* w skład którego wchodzi wspomniany siedmiopeptyd. Może z tym wiązać się mniejsza alergienność tych prątków, jakkolwiek głównym powodem słabszej alergii poszczepiennej w stosunku do alergii śródzakaznej jest stosunkowo krótka żywotność prątków BCG w ustroju szczepionym. Niemniej jednak, jak wykazały badania laboratoryjne na zwierzętach doświadczalnych, rodzaj wosku *D* decyduje o właściwościach odpowiedzi immunologicznej na białka. Biorąc pod uwagę to, że prątki nie posiadające wosku *D* z siedmiopeptydem mimo wszystko powodują alergię komórkową (tuberkulinową i sensytnową) można przyjąć, że również inne lipidy prątków mogą posiadać właściwości biologiczne podobne do właściwości wosku *D*. Czy utrata frakcji wosku *D* przez prątki pod wpływem chemioterapii może powodować spadek uczulenia tuberkulinowego; pytanie to nasuwa się z okazji negatywizacji reakcji tuberkulinowej pod wpływem leczenia przeciwprątkowego.

Wosk *D* o budowie lipopolisacharyd — siedmiopeptyd, posiada aktywność adjuwansu immunologicznego tzn. jest czynnikiem, który nasila własności immunogenne różnych antygenów białkowych, nie wpływając na immunogenność różnych antygenów wielocukrowych. Nie sposób wymienić licznych przykładów wskazujących na tę szczególną właściwość biologiczną wosku *D* i prątków zawierających tę jego odmianę. Przez dodanie wosku *D* lub zabitych „na gorąco” prątków do ekstraktu tkanki mózgowej królika wywołuje się u królików doświadczalne alergiczne zapalenie centralnego układu nerwowego (EAE — *Encephalitis Allergica Experimentalis*). Jak z tego wynika homologiczna tkanka względnie jej ekstrakt przez dodatek wosku *D* staje się silnym immunogenem pod wpływem którego pojawiają się komórki uczulone na własną (zwierzęcia) tkankę mózgową oraz swoiste dla tej tkanki przeciwciała. Wosk *D* w odpowiedniej kompozycji z lekkim olejem mineralnym jest fazą olejową adjuwansu Freund'a, która łączy się z fazą wodną, zawierającą antygen za pomocą detergentu (Arlacel A) jako emulgatora. Jeszcze silniejsze

działanie adjuwansowe uzyskuje się przez dodatek zabitych prątków do tego adjuwansu.

Tuberkuliny i ich analogony, przygotowane z przesączów hodowli płynnych prątków atypowych, nazwane sensytnami, dają reakcje krzyżowe tj. dodatnie reakcje zarówno w przypadku zakażenia czynnikiem dla nich homologicznym, jak i heterologicznym. Najczęściej w układzie homologicznym reakcja tuberkulinowa jest intensywniejsza niż w układzie heterologicznym. Aby uzyskać preparaty diagnostyczne, jednoznacznie wykrywające tło zakażenia, podjęto w ostatnich latach dość liczne próby uzyskiwania preparatów swoistych wyłącznie dla określonego gatunku prątka. Sama kontrola swoistości takich preparatów musi opierać się wyłącznie na próbach skórnych u zwierząt (świnki morskie) uczulonych homologicznym i heterologicznym prątkiem, bowiem znacznie łatwiejsze do przeprowadzenia próby serologiczne (jak immunodyszja), nie nadają się do określenia swoistości alergicznej, wykazują one tylko determinaty swoiste, wykrywalne metodami serologicznymi. W tych poszukiwaniach frakcji białkowych różnych gatunków prątków, skierowano również uwagę na białka komórkowe prątków (prócz zwykle używanych do tego celu białek przesączów hodowli płynnych). Badania te wprawdzie były wieńczzone niekiedy pomyślnymi wynikami, ale stosowane w nich metody oddzielania białek swoistych nie nadają się do zastosowania na skalę produkcyjną, która zapewnia przygotowanie preparatów diagnostycznych w dużych ilościach, potrzebnych do stosowania w populacjach ludzkich.

Pierwszym rodzajem komórki organizmu, która wchodzi w kontakt z prątkiem w zakażeniu naturalnym lub szczepieniu BCG jest makrofag. Komórka ta fagocytuje prątki tak samo jak inne bakterie lub cząstki obojętne. Na przebieg tego wstępnego etapu, tj. na losy sfagocytowanych prątków i na losy makrofaga, które te prątki sfagocytował, wpływają własności biologiczne prątków. Jeżeli makrofag sfagocytuje zbyt duże ilości prątków, to nawet w przypadku prątków BCG podlega on zwyrodnieniu i rozpadowi. Najpewniej, główną przyczyną tego cytotoksycznego oddziaływania prątków jest ich czynnik wiązkowy (CF — Cord Factor), który pod względem chemicznym jest estrem o budowie 6,6-dwumykolonoilo-trehalozy. Czynnik wiązkowy prątków wirulentnych i prątków atenuowanych jak BCG ma w zasadzie taką samą budowę, a różna ich toksyczność wiąże się z różnymi kwasami mykolowymi, prawdopodobnie posiadającymi różne w każdym przypadku ilości odgałęzień bocznych i różne ilości grupy frakcyjnych.

Fagocytoza prątków przez makrofagi zapoczątkowuje odpowiedź immunologiczną. Według ogólnie przyjętego poglądu w makrofagach przebiega proces „przetwarzania” antygeny na „superantygen”. W przypadku pojedynczych antygenów, jak określone białka, proces taki wydaje się być dość prosty. Ma on polegać na odszczepianiu determinant antygenowych z cząsteczki antygeny i łączeniu ich ze swoim RNA oraz przekazy-

waniu w takiej postaci limfocytom. Jak jednak ten proces „przetwarzania” przedstawia się w przypadku tak złożonych antygenów jak komórki bakteryjne, a zwłaszcza komórka prątka, nie znajdujemy odpowiedzi. Dlaczego pierwszym zjawiskiem immunologicznym jest alergia tuberkulinowa, natomiast synteza przeciwciał nie zostaje podjęta. Czy przyczyną tych różnic jest wyłącznie obecność wosku *D*. Wydaje się, że takie przypuszczenia są niewystarczające dla motywowania tych istotnych różnic, albowiem wosk *D*, jako składnik adjuwansu, nasila immunogenność innych białek (jak toksoid błoniczy), powodując tym samym, że organizm syntetyzuje znacznie więcej antytoksyny, niż pod wpływem samego toksoidu. Nie wiadomo dlaczego u człowieka dopiero w bardzo późnym okresie zakażenia prątkiem wirulentnym pojawiają się przeciwciała antywielocukrowcowe i antybiałkowe, a więc bardzo późno następuje stymulowanie układu komórek plazmatycznych. Można przeto wysunąć przypuszczenie, że mechanizmy immunologiczne w ustroju zakażonym zmieniają się z biegiem czasu, przy czym nie znamy czynników regulujących lub wyzwalających te zmiany.

Jako podstawę do dalszych rozważań nad znaczeniem uczulenia tuberkulinowego, przyjmijmy okres po szczepieniu BCG. Jak to wielokrotnie stwierdzono w badaniach na różnych zwierzętach doświadczalnych, po wstrzyknięciu żywej szczepionki BCG w różnych tkankach, jak płuca, węzły limfatyczne, śledziona itp. pojawiają się żywe prątki BCG w dużej ilości, lecz po kilku tygodniach ilość żywych cząstek BCG maleje i w końcu posiewy bakteriologiczne dają wyniki ujemne. To znikanie żywych prątków BCG, lub powiedzmy ostrożniej prątków wyrastających na podłożach bakteriologicznych, łączy się z pojawieniem i rozwojem alergii tuberkulinowej. W przypadku zakażenia wirulentnymi prątkami alergia utrzymuje się pomimo dalszego rozmnażania i rozsiewu wymienionych prątków.

W węzłach limfatycznych, w których istnieje ścisły kontakt pomiędzy makrofagami a małymi limfocytami, antygen jako superantygen zostaje przez makrofagi przekazany małym limfocytom. Pod wpływem superantygeny w limfocytach pojawiają się zmiany morfologiczne, które nazywamy transformacją limfocytów. Małe limfocyty podlegają przemianie na komórki czynnościowo młodsze, zwane limfoblastami lub ze względu na rozmiar i barwliwość — dużymi komórkami pironinofilnymi lub komórkami zasadochłonnymi. Limfoblasty szybko rozmnażają się, za czym przemawiają obecnie często spotykane ich formy mitotyczne. Po pewnym czasie, po kolejnych podziałach, zamieniają się znowu na małe limfocyty. Te ostatnie różnią się jednak od normalnych małych limfocytów albowiem nabywają zdolność „zapamiętywania” antygeny, są komórkami pamięci immunologicznej. Komórki pamięci immunologicznej opuszczają tkankę limfatyczną i w ten sposób przenoszą tę swoistą immunologicznie pamięć, do miejsc położonych daleko od miejsca wprowadzenia lub miejsca wtargnięcia antygeny. Komórki pamięci immunologicznej,

jak wykazały badania z użyciem izotopów radioczynnych, są komórkami długo żyjącymi, utrzymującymi się w ustroju przez szereg lat, czym można tłumaczyć wieloletnie trwanie uczulenia tuberkulinowego.

Pewna ilość limfoblastów ma transformować na makrofagi. Odnosnie transformacji na plazmocyty, czyli komórki wytwarzające immunoglobuliny i swoiste przeciwciała, to zakażenie wirulentnym prątkiem, względnie szczepienie BCG, tego rodzaju pierwotnej odpowiedzi immunologicznej nie wywołuje. Plazmocyty mają pochodzić z czynnościowo młodszych komórek plazmatycznych, zwanych plazmoblastami, które na podstawie badań morfologicznych nie dają się odróżnić od limfoblastów.

Małe limfocyty, które stanowią podstawę uczulenia komórkowego, w naszym przypadku uczulenia tuberkulinowego, należą do układu komórkowego „zależnego od grasicy”. Grasica jest narządem, który daje im początek. Są to limfocyty *T* (*thymus*). W węzłach limfatycznych zajmują one strefę parakortykalną. Drugi układ tych komórek niezależny od grasicy znajduje się w follikułach, a właściwie w ośrodkach odczynowych, znajdujących się w obwodowej warstwie grasicy, tuż pod torebką. Wszystkie wrodzone zaburzenia dotyczące powstawania grasicy są przyczyną stanów klinicznych, w których indukowanie uczulenia komórkowego nie jest możliwe, odnosi się to nie tylko do uczulenia tuberkulinowego, ale również do uczulenia na inne antygeny bakteryjne, czy braku odrzucania homografitów itp., ogólnie stanów immunologicznych uzależnionych od małych limfocytów „zależnych” od grasicy. Drugą przyczyną upośledzenia układu immunologicznego — limfocytów „zależnych od grasicy, a więc tym samym negatywizacji także różnych komórkowych stanów nadwrażliwości, są leki immunosupresyjne i niektóre antybiotyki, posiadające podobne do nich właściwości. Często ze spadkiem uczulenia, pod wpływem tych substancji, następuje wysiew prątków gruźlicy. Dla limfocytarnego deficytu immunologicznego, zwanego syndromem De George'a (zaburzenia w powstawaniu grasicy z trzeciej i czwartej kieszonki gardłowej) częstym zjawiskiem są zakażenia prątkami atypowymi. Zakażenia te przebiegają bez uczulenia tuberkulinowego (sensytynowego) z powodu braku małych limfocytów w strefie parakortykalnej węzłów limfatycznych i braku ich w krwi obwodowej.

W ciągu ostatnich 20 lat stwierdzono, że uczulenie tuberkulinowe i odporność przeciwgruźlicza mają wspólne podstawy, bowiem w obu przypadkach są to immunologiczne procesy komórkowe. Na podjęcie wspólnych badań nad związkiem pomiędzy tymi oboma procesami immunologicznymi złożyły się następujące okoliczności: a) przenoszenie uczulenia tuberkulinowego i innych rodzajów uczulenia komórkowego z czynnie uczulonego dawcy na normalnego biorcę, i b) poznanie i zbadanie mechanizmu oraz wzajemnego związku dwóch cytoimmunologicznych odczynów *in vitro* — testu transformacji blastycznej małych limfocytów i testu makrofagów.

Wielokrotnie ponawiane próby przeniesienia uczulenia tuberkulinowego, za pomocą surowicy zwierzęcia czynnie uczulonego na normalne zwierzę — biorcę, zawsze wypadały ujemnie. Pomyślne wyniki biernego przeniesienia po raz pierwszy uzyskano za pomocą komórek wysięku otrzewnowego zwierząt uczulonych. Ta biernie wywołana alergja tuberkulinowa, przejawiała się dodatnią reakcją tuberkulinową chociaż słabszą niż u dawcy komórek uczulonych, niemniej była ona jednak bardzo trwała, utrzymywała się przez szereg miesięcy — a u ludzi nawet przez wiele lat.

Przeniesione komórki, a jak późniejsze badania wykazały, małe limfocyty przenosiły tylko uczulenie tuberkulinowe, natomiast nie uzyskiwano tym sposobem odporności przeciw zakażeniu wirulentnym prątkiem, mimo że dawca komórek wykazywał wysoką odporność. Ta okoliczność stała się powodem, że proces powstawania odporności przeciwgruźliczej, uważano za zupełnie oddzielne, a nawet niezależne od siebie procesy immunologiczne. Dopiero odczyny cytoimmunologiczne *in vitro* wykazały, że pomiędzy oboma procesami immunologicznymi *in vivo* istnieje ścisły związek. W hodowli *in vitro* małe limfocyty osobnika tuberkulino-dodatniego pod wpływem dodatku tuberkuliny podlegają transformacji blastycznej. Najczęściej w badaniach tych stosuje się limfocyty krwi obwodowej; większość tych badań wykonano na limfocytach krwi człowieka. W hodowlach stymulowanych tuberkuliną komórki wykazują figury mitotyczne, co przemawia za tym, że mają one tendencję do rozmnażania się, a jedynie warunki hodowli nie umożliwiają tego. Powstałe z małych limfocytów komórki posiadają wszystkie cechy limfoblastów, stąd nazwa — transformacja limfoblastyczna. Pomiedzy uczuleniem tuberkulinowym, mierzonym skórną próbą tuberkulinową, a transformacją blastyczną, *in vitro*, musi istnieć ścisły związek przyczynowy. Nie należy jednak wnioskować, że musi to być ścisła proporcjonalność pomiędzy średnią z nacieku skórnoego a procentem limfoblastów, albowiem oba odczyny przebiegają w całkowicie odmiennych warunkach. Naciek skórny w reakcji tuberkulinowej składa się z kilku gatunków komórek jednojądrzastych — w teście transformacji blastycznej biorą udział wyłącznie małe limfocyty. W latach znacznie poprzedzających odkrycie testu transformacji blastycznej małych limfocytów wykazano, że w krwi osobnika uczulonego na tuberkulinę znajdują się małe limfocyty, które wiążą te tuberkuloproteiny na swojej powierzchni. W badaniach tych stosowano ^{131}I tuberkulinę, lub zwykłą tuberkulinę, której związanie przez powierzchnię limfocyta wykazywano za pomocą fluoresceinowych konjugatów zwierzęcych surowic antytuberkulinowych. Uczulone limfocyty posiadają na powierzchni substancję „podobną” do przeciwciała, nie jest ona bowiem immunoglobuliną, ale posiada własności przeciwciała.

Limfocyty małe osobników normalnych i uczulonych na tuberkulinę podlegają transformacji blastycznej pod wpływem fitohemaglutyniny

(PHA). Ten rodzaj transformacji wypada ujemnie w przypadku limfocytów osób chorych na sarkoidozę i ziarnicę złośliwą. Jak wiadomo, osoby z sarkoidozą nie podlegają uczuleniu komórkowemu. Okoliczność ta jeszcze raz wskazuje, że pomiędzy aktywnością małych limfocytów, tj. ich zdolnością transformowania a reakcjami alergicznymi typu komórkowego istnieje związek. W czynnej gruźlicy procent transformujących małych limfocytów jest z reguły mniejszy aniżeli u tuberkulino-dodatnich osób zdrowych.

Odczyn hamowania migracji makrofagów umożliwił wykrycie związku pomiędzy uczulonymi limfocytami i makrofagami, które stanowią w gruźlicy wyłączny rodzaj komórki obronnej. W hodowli, *in vitro* makrofagi migrują z eksplantatu na zewnątrz. Tak samo zachowują się makrofagi osób tuberkulino-ujemnych i tuberkulino-dodatnich. Pod wpływem dodatku tuberkuliny do hodowli, makrofagi osobników tuberkulino-ujemnych w dalszym ciągu zachowują zdolność migrowania, natomiast makrofagi osób tuberkulino-dodatnich ulegają unieruchomieniu. Zjawisko swoistego hamowania makrofagów przez tuberkulinę jest uzależnione od obecności w ich hodowli małych limfocytów; czyste hodowle makrofagów nie reagują porażeniem ruchliwości na obecność tuberkuliny. W ten sposób po raz pierwszy *in vitro* wykazano zależność jednego procesu od drugiego tj. obecności uczulonych limfocytów i ich reakcji ze swoistym antygenem.

Uczulone prątkiem limfocyty, poddane reakcji z tuberkuliną, wydzielają szereg rozpuszczalnych czynników, biologicznie czynnych. Pierwszym z nich, znanym od dość dawna i lepiej poznanym jest „czynnik przenoszący” czyli TF (Transfer factor). Znajduje się on w płynie hodowli limfocytów z dodatkiem tuberkuliny. Biologiczną właściwością TF jest bierne przenoszenie uczulenia tuberkulinowego z czynnie uczulonego dawcy na normalnego biorcę. Indukowane w ten sposób uczulenie tuberkulinowe u biorców manifestuje się dodatnią reakcją tuberkulinową, chociaż słabszą aniżeli u tuberkulino-dodatniego dawcy limfocytów. TF jest substancją niskocząsteczkową, przechodzącą przez błony dializacyjne, nieprzepuszczalne dla białek. Początkowo tylko u człowieka otrzymano dodatnie wyniki przeniesienia uczulenia tuberkulinowego za pomocą TF. Dopiero później próby przenoszenia dały również dodatnie wyniki u świńek morskich i królików. Limfocyty człowieka zawierają znacznie więcej TF aniżeli limfocyty obu wymienionych gatunków zwierząt, a już bardzo dużo, w porównaniu z limfocytami myszy i szczurów.

Oprócz czynnika TF uczulony limfocyt w reakcji z tuberkuliną wydziela ponadto szereg innych rozpuszczalnych czynników, z których należy wymienić: a) czynnik chemotaktyczny, przyciągający monocyty krwi do miejsca reakcji limfocyta z antygenem, b) czynnik mitogenny, który stymuluje mitozę w przyciągniętych monocytach, c) czynnik transformujący monocyty na makrofagi i d) czynnik hamujący migrację makrofa-

gów, zwany czynnikiem MIF (Migration Inhibition Factor). Czynniki te w ostatnich latach wyodrębniono w postaci oczyszczonych frakcji za pomocą filtracji molekularnej i chromatografii na jonowymiennych kolumnach.

Dopiero poznanie takich faktów, jak przenoszenie bierne uczulenia komórkowego za pomocą limfocytów i czynnika TF, istnienie szeregu rozpuszczalnych czynników wydzielanych przez uczulone limfocyty w przebiegu reakcji ze swoistym dla uczulenia antygenem, w końcu zależność swoistego hamowania migracji makrofagów od limfocytów i wydzielanych przez nie produktów umożliwiło wgląd w związek pomiędzy swoistym uczuleniem, a więc również uczuleniem tuberkulinowym i odpornością przeciwgruźliczą.

W pierwszym rzędzie stwierdzono, że biernie przeniesione limfocyty tuberkulino-dodatniego dawcy uodpornionego na prątek gruźlicy, przenoszą nie tylko uczulenie tuberkulinowe ale również stan gotowości obronnej. Wynikło to z badań, w których prócz uczulonych limfocytów, równocześnie podano antygen swoisty.

Uczulony limfocyt, pod wpływem reakcji z antygenem, wydziela poprzednio wymienione czynniki rozpuszczalne, które indukują proces aktywowania makrofagów. Polega on kolejno na akumulowaniu monocytów, ich transformacji na makrofagi i unieruchomieniu makrofagów i w końcu na wewnątrzkomórkowych przemianach w tych komórkach, polegających na ilościowym wzroście organelli cytoplazmatycznych a w tym przede wszystkim ziarenek lizosomalnych. Są to skupienia enzymów hydrolitycznych: kwaśnej fosfatazy, lizozymu, katepsyny, rybonukleazy, dezoksyrybonukleazy, esteraz itp., w sumie doliczono się ponad czterdzieści różnych hydrolitycznych enzymów, które są w stanie hydrolizować różne wysokocząsteczkowe substancje, w tym również antygeny bakteryjne, lub odszczepiać fosfor w postaci nieorganicznej itp. Aktywowanie makrofagów polega również na wzroście ich bakteriobójczego działania na wiele bakterii. Ta bakteriobójczość nie jest immunologicznie swoista, tj. skierowana na ten gatunek bakterii, którego antygen uczulił limfocyty a we wtórnej reakcji spowodował wydzielanie szeregu czynników aktywujących makrofagi. Odnosi się ona równocześnie do wielu zupełnie ze sobą niespokrewnionych bakterii jak *Salmonella*, *Brucella*, *Listeria* i *Mycobacterium*.

Do badania swoistej bakteriobójczości *in vivo* i *in vitro*, stosuje się przede wszystkim *Listeria monocytogenes* — bakterię niechorobotwórczą dla człowieka, a u małych gryzoni powodującą ostrą chorobę zakaźną. Najmniej przydatny w tych badaniach jest prątek gruźlicy, ponieważ rozmnaża się powoli i wytwarza substancje cytotoksyczne dla makrofagów jak CF. W naszych własnych badaniach mogliśmy wykazać, że nawet minimalne dawki żywej szczepionki BCG indukują odporność wystarczająco wysoką, aby spowodować szybkie eliminowanie drugiej daw-

ki żywych prątków BCG, wstrzykniętych dosercowo po upływie 3, 9 i 15 miesięcy po pierwszej dawce BCG. W wymienionych okresach czasu u świnek morskich alergia tuberkulinowa utrzymywała się na dość wysokim poziomie. Po wygaśnięciu odporności przeciwprątkowej alergia utrzymuje się jeszcze na dość znacznym poziomie przez długi okres czasu. Ta okoliczność posiada istotne znaczenie dla reaktywowania odporności przeciwprątkowej, bowiem pod wpływem powtórnego wstrzyknięcia tego samego, jak pierwotnie, antygeny następuje szybkie swoiste pobudzenie całego układu immunologicznego, przy czym zarówno uczulenie tuberkulinowe jak i odporność przeciwgruźlicza uzyskują wyższy poziom niżeli pierwotnie. Jest to rodzaj wtórnej odpowiedzi immunologicznej polegający na reaktywowaniu limfocytów i makrofagów. Uczulone limfocyty pojawiają się w większej ilości niżeli w pierwotnej odpowiedzi immunologicznej, pod wpływem swoistego antygeny powodują układowe aktywowanie makrofagów. Jeżeli zamiast swoistego antygeny zostanie użyty inny antygen, wtedy pojawia się pierwotna odpowiedź na ten drugi antygen, a więc proces immunologiczny znowu zaczyna się od początku. Tylko pod wpływem swoistego dla uczulenia antygeny limfocyty wydzielają poprzednio wspomniane czynniki monitorowe, dla układu komórkowego monocyty — makrofagi.

Z dotychczasowych badań doświadczalnych wynika, że odporność przeciwgruźlicza składa się z dwóch procesów: a) swoistego immunologicznie, którym jest uczulenie komórkowe, w przypadku immunizowania prątkiem BCG lub zakażenia prątkiem wirulentnym, przejawiające się dodatnią reakcją komórkową i b) nieswoistego immunologicznie procesu rozgrywającego się wewnątrz makrofagów, posiadającego wpływ bakterio-bójczy na szereg bakterii nie spokrewnionych ze sobą antygenowo. Ten nieswoisty proces jest inicjowany przez proces swoisty rozgrywający się pomiędzy uczulonym limfocytym a antygenem, a więc wtórną odpowiedź immunologiczną.

Na kanwie tych rozważań można powątpiewać, czy słuszny jest podział szczepionek BCG na szczepionki silnie i słabo alergizujące, przypisując przy tym obu tym szczepionkom w zasadzie takie samo działanie immunogenne jeżeli chodzi o odporność przeciwgruźliczą. Taki sposób rozumowania był prawidłowy i dopuszczalny do momentu stwierdzenia, że uczulenie tuberkulinowe i odporność przeciwgruźlicza są dwoma zupełnie od siebie niezależnymi procesami.

Obecnie powinniśmy raczej przyjąć, że wysoki poziom poszczepiennej alergii tuberkulinowej jest zjawiskiem wybitnie korzystnym dla odporności przeciwgruźliczej. Można przyjąć, że wysoki poziom uczulenia wskazuje na dużą ilość uczulonych limfocytów i tym samym na potencjalne wyzwalenie dużej ilości poprzednio wymienionych substancji monitorowych, wyzwalanych pod wpływem reakcji pomiędzy uczulonym limfocytym i swoistym antygenem. Prowadzi to do układowego aktywowania

makrofagów i stanowi ochronę przed rozsiewem zakażenia, czyli pojawieniem się ognisk wtórnych, bowiem prątki uwolnione z rozpadłego makrofaga podlegają wchłonięciu przez aktywowane makrofagi, które wpływają hamująco lub bakteriobójczo na nie. Na marginesie tego przypuszczenia należy przypomnieć, że makrofagi „odpornościowe” i makrofagi królików naturalnie opornych na zakażenie prątkiem ludzkim hamują serpentynowaty wzrost tych prątków. Rosną one wtedy wewnątrzkomórkowo w różnych kierunkach tak samo jak sfagocytowane prątki niechobotwórcze.

Skutecznie działająca szczepionka BCG powinna stymulować możliwie jak największą ilość komórek układu siateczkowo-środbłonkowego i usuwać duże ilości limfocytów, aby zapewnić dostatecznie wysoką odporność przeciwgruźliczą. Postulat ten może być spełniony przez podanie odpowiednio wysokiej dawki żywej szczepionki oraz jej zdolności proliferowania w okresie poszczepiennym w ustroju. Te dwa czynniki posiadają główne znaczenie dla uczulenia tuberkulinowego i odporności przeciwgruźliczej. Szczepionki słabo alergizujące są w zasadzie szczepionkami o słabej żywotności, zawierają raczej niską liczbę żywych cząstek BCG, szybko podlegają zabiciu wewnątrz ustroju i tym samym nie są w stanie indukować długotrwałej alergii tuberkulinowej o wysokim poziomie.

Współdziałanie limfocytów uczulonych i makrofagów tłumaczy również powstawanie gruzełka, który należy uważać za wyraz lokalnej komórkowej odpowiedzi immunologicznej.

Według jednej teorii, makrofag zakażony prątkiem, wydziela superantygen, pod wpływem którego pojawiają się uczulone limfocyty. Limfocyt, pod wpływem reakcji z antygenem, przyciąga monocyty z krwiobieg, które rozmnażają się i transformują na makrofagi, podlegające lokalnemu unieruchomieniu. Według drugiej teorii lub hipotezy powstawania gruzełka podstawową rolę odgrywają przeciwciała cytofilne, które znajdują się na powierzchni makrofagów. Pod wpływem antygeny, znajdującego się w zakażonym makrofagu i wydzielanym do otoczenia, makrofagi posiadające na swojej powierzchni przeciwciała cytofilne gromadzą się i w ten sposób powstaje gruzełek. W związku z hipotezą powstawania gruzełka w następstwie reakcji przeciwciał cytofilnych z antygenem należy przypomnieć, że ogólnie przyjmuje się, że przeciwciała nie posiadają znaczenia w gruźlicy. Wydaje się jednak, że twierdzenie to w pierwszym rzędzie odnosi się do znaczenia przeciwciał w serologicznej diagnostyce gruźlicy. Przeciwciała cytofilne są wytwarzane tak samo jak inne przeciwciała przez komórki plazmatyczne, skąd dostają się do krwiobieg i są selektywnie wychwytywane przez makrofagi. Można wysunąć przypuszczenie, że rzeczywiście odgrywają one pewną rolę w immunologii gruźlicy i szczepień ochronnych, ale ze względu na niski poziom wykazywanie ich za pomocą konwencjonalnych prób serologicz-

nych nie jest możliwe. W przypadku makrofagów mogą rozwijać swoje swoiste działanie bowiem podlegają na powierzchni tych komórek akumulacji. Dodajmy, że pod wpływem często wykonywanych prób tuberkulinowych w nacieku tuberkulinowym pojawia się coraz większa ilość komórek plazmatycznych. Obok typowego nacieku czyli stwardnienia, a więc reakcji immunologicznej komórkowej, przy częstym wykonywaniu odczynu tuberkulinowego pojawia się reakcja typu Arthusa, powodowana przez przeciwciała a mianowicie wytwarzanie kompleksu antygen — przeciwciało.

Skoro druga dawka żywej szczepionki BCG podlega szybkiemu zabiściu pod wpływem bakteriobójczego działania aktywowanych makrofagów, należy starać się odpowiedzieć, czy dawka ta oddziałuje tak samo jak pierwsza dawka żywej szczepionki BCG, czy raczej działa tylko jako bodziec antygenowy, indukujący wtórną reakcję immunologiczną w sposób poprzednio opisany, czyli reaktywuje wygasającą odporność poprzez pobudzenie uczulonych limfocytów do wydzielania różnych substancji monitorowych. Stąd też nasuwa się pytanie, czy nie wystarczyłaby wobec tego nieżywa szczepionka BCG jako czynnik zastępczy dla wtórnej dawki szczepionki żywej ale szybko ginącej w ustroju. Dodajmy, że reakcja tuberkulinowa organizmu uczulonego prątkiem BCG jest tylko jednym rodzajem wtórnej odpowiedzi immunologicznej. Jeżeli królikowi uczulonemu prątkiem BCG wstrzyknie się dożylnie zabite prątki BCG, wtedy nie reaguje on krwiotocznym procesem zapalnym w płucach, jak po dożylnym wstrzyknięciu tuberkuliny, lecz odczynem komórkowym, polegającym na akumulacji dużej ilości aktywowanych makrofagów, bogatszych w różne enzymy hydrolityczne. Rzecz oczywista, że konieczne są w tym przypadku szeroko zakrojone badania doświadczalne. Dotychczasowe badania nad immunogennością różnych nieżywych szczepionek przeciwgruźliczych odnosiły się do pierwotnej odpowiedzi immunologicznej, najczęściej mierzonej wyłącznie alergią tuberkulinową oraz indeksem śledzionowym i liczbą żywych cząstek w śledzionie, w końcu okresem przeżycia zwierząt immunizowanych w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Obecnie, kiedy arsenał metod badania został znacznie wzbogacony, istnieją możliwości ponownego skontrolowania wartości ochronnej różnych typów nieżywej szczepionki i to nie na modelu pierwotnej odpowiedzi immunologicznej lecz wtórnej.

LITERATURA

1. Amos H. E., Lachman P. J.: The immunological specificity of a macrophage inhibition factor. *Immunology*, 18, 269, 1970
2. Blanden R. V., Lefford M. J., Mackaness C. B.: The host response to Calmette-Guerin bacillus infection in mice. *J. Exp. Med.* 129, 1079, 1969
3. David J. R., Al-Asari S., Lawrence H. S., Thomas L.: The specificity of inhibition of cell migration by antigens. *J. Immunol.* 93, 264, 1964

4. Danenberg A. M.: Cellular hypersensitivity and cellular immunity in the pathogenesis of tuberculosis: specificity, systemic and local nature, and associated macrophage enzymes. *Bacteriol. Rev.* 32, 85, 1968
5. George M., Vaughan J. H., *In vitro* cell migration as a model for delayed sensitivity. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* 111, 514, 1962
6. Lawrance H. S., Landy M.: *Mediators of cellular immunity*, Academic Press. Inc. New York, 1969
7. Lurie M. B.: *Resistance to Tuberculosis. Experimental studies in native and acquired defensive mechanisms* Harvard University Press. Cambridge, Mass. 1964
8. Mackaness G.B.: The immunological basis of acquired cellular resistance. *J. Expt. Med.* 120., 105, 1964
9. Mackaness G. B., Blanden R. V.: Cellular immunity. *Progr. Allergy* 11, 89, 1967
10. Mackaness G. B.: The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity *in vivo*. *J. Expt. Med.* 129, 973, 1969
11. Mackaness G. B.: The mechanisms of macrophage activation. W: *Infections agents and host reactions*. Stuard Mudd. Wyd. W. B. Saunders Comp. Philadelphia, 1970
12. Najarian J. S., Feldman J. D.: Passive transfer of tuberculin sensitivity of tritiated thymidine-labeled lymphoid cells. *J. Exp. Med.* 114, 779, 1961
13. Patterson R. J., Youmans G.: Demonstration in tissue culture of lymphocyte mediated immunity to *tuberculosis*. *Infect. Immunity*, 1, 600, 1970.
14. Suter E., Ramseier H.: Cellular reactions in infection. *Adv. Immunol.* 4, 117, 1964
15. Turk J. L.: *Delayed hypersensitivity*. North-Holland. Publ. Comp. Amsterdam 1967
16. Turk J. L.: The passive transfer of delayed hypersensitivity in guinea pigs by the transfer of isotopically labelled lymphoid cells. *Immunology*, 5, 478, 1962
17. Ward P. A., Renold H. G., David J. R.: The production by antigen stimulated lymphocytes of a leucostatic factor distinct from migration inhibitory factor. *Cell. Immunol.* 2, 1962, 1970

L. Rzucidło

SOME IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF TUBERCULIN SENSITIZATION AND REACTION

Summary

Tuberculin sensitivity is a primary immunological response mediated by cells, to natural infection or BCG vaccination. The tuberculin reaction is the secondary immunological cellular response to the tubercle bacillus proteins.

Tuberculin sensitization is induced by the specific tubercle proteins in the presence of lipidic fractions of mycobacteria active as adjuvants. Waxes D of human bacillus and some atypical acid-fast bacilli act as adjuvants, the same chemical constituents of other mycobacteria, also BCG bacilli, do not act as adjuvants. The most specific protein antigens are the enzymatic proteins of mycobacteria found also in culture filtrates. The appreciation of the tuberculin and sensitin preparation specificities can not be based on serological methods of examination, e.g. immunodiffusion tests only the diameters of the skin indurations of sensitized individuals are a measure of specificity and sensitivity. The results obtained in sensitized animals could not be fully interpreted in man.

Macrophages are the cells which first come into contact with mycobacteria. They preform the antigens and transmit them to the lymphocytes. In this way sensitized lymphocytes product a specific substance, "antibody-like", reacting with tubercle proteins. They ars the main type of immunological active cells; react with blastic transformation *in vitro* in the presence of tubercle proteins, and produce mocrophage inhibition factor, which causes the inhibition of macrophages in the presence of tuberculin.

Clinically, there are individuals, mostly children, with different immunological deficiencies. These individuals show: a) lack of tuberculin sensitivity, or b) do not posses the control of the infections with atypical mycobacteria of low virulence. The immunological deficiencies are of two kinds: a) primary, genetically determined, and b) secondary, acquired.