

В.В. АФАНАСЬЕВА, К.П. ЗАК, А.К. БУТЕНКО

Институт эндокринологии и обмена веществ
АМН Украины, Киев

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ И УЛЬТРАЦИТОХИМИЯ ЛИМФОЦИТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ТЕЛЬЦА ГОЛЛА, КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ



Проведено электронно-микроскопическое и ультрацитохимическое исследование лимфоцитов крови здорового человека, содержащих тельца Голла (ТГ), которые характерны для субпопуляции CD4⁺ клеток. Установлено, что ТГ имеет довольно сложное субмикроскопическое строение и вместе с его дериватами — гранулами-спутниками, а также митохондриями, микрофиламентами, канальцами ГЭР и аппаратом Гольджи образует единый активный функциональный комплекс. В ТГ определяется высокая активность кислой фосфатазы и положительная реакция на гликоген. Полученные данные дают основание полагать о ведущей роли ТГ в продукции цитокинов и других биологически активных веществ.

© В.В. АФАНАСЬЕВА, К.П. ЗАК, А.К. БУТЕНКО, 2003

Введение. История изучения ультраструктуры лимфоцитов крови человека насчитывает несколько десятилетий. Однако до настоящего времени сведения о субмикроскопической организации лимфоцитов в зависимости от их различной функции и иммунологического фенотипа довольно ограничены и противоречивы. Нет ясного представления о роли некоторых цитоплазматических органелл в функционировании лимфоцитов и их взаимосвязи с иммунофенотипом. Это, в первую очередь, относится к такой уникальной органелле, как тельце Голла (ТГ), выявляемое в лимфоцитах только на ультраструктурном уровне. ТГ впервые было описано в 1936 г. американским исследователем Голлом [1]. Довольно долго считалось, что ТГ — просто жировая капля. Но при изучении лимфоцитов с помощью электронного микроскопа было установлено, что ТГ представляет собой гранулу размером 0,3–0,7 мкм правильной округлой формы со светлым центром и темным ободком [2]. При ультрацитохимических исследованиях в ТГ были обнаружены фосфолипиды, кислые гидролазы, β -глюкуронидаза, кислая фосфатаза, кислая α -нафтилацетат эстераза и липиды [3–5]. В дальнейшем при изучении иммунологически однородных субпопуляций лимфоцитов, выделенных с помощью проточной цитометрии [6, 7], было установлено, что ТГ обнаруживаются в лимфоцитах, экспрессирующих CD4 антиген. Однако информация о субмикроскопической организации ТГ и его роли в функции лимфоцитов остается недостаточной.

Нашей задачей стало получение более детальной информации о субмикроскопическом строении и функции ТГ лимфоцитов крови у здоровых людей и у больных с иммунологическими нарушениями, сопровождающимися изменениями уровня CD4⁺ клеток в крови (сахарный диабет 1-го и 2-го типа, болезнь Ходжкина, рак почки и щитовидной железы, воздействия облучения в результате аварии на ЧАЭС).

В настоящей работе представлены результаты электронно-микроскопических и ультрацитохимических исследований лимфоцитов крови здоровых людей с нормальным иммунофенотипом.

Материалы и методы. Исследования были проведены у 30 практически здоровых людей (первичные доноры). Выделенную из гепаринизированной венозной крови лейкоцитарно-тромбоцитарную клеточную взвесь, а также фракцию лимфоцитов, обогащенных CD4⁺ клетками, которые выделены с помощью проточной

цитометрии на лазерном сортировщике клеток FACS-tar plus (США), фиксировали в 2,5%-ном глутаральдегиде (фирмы «Sigma») на 0,1 М какодилатном буфере (фирмы «Sigma»), постфиксировали 1%-ным OsO_4 на том же буфере и заключали в аралдит (фирмы «Fluka»). Активность кислой фосфатазы выявляли свинцовым, пероксидазы — диаминобензидиновым [8], гликогена — феррицианид-осмиевым методами [9, 10].

Ультратонкие срезы готовили на ультратоме LKB-8800 (фирмы LKB, Швеция). В зависимости от цели исследования срезы последовательно контрастировали спиртовым раствором уксуснокислого уранила и цитратом свинца, либо только цитратом свинца или уксуснокислым уранилом и изучали под электронным микроскопом JEM-100 С (фирмы JEOL, Япония).

Результаты исследований и их обсуждение. Проведенными исследованиями установлено, что в крови здорового человека ТГ обнаруживается чаще всего в лимфоцитах с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (рис. 1, а). Обычно в цитоплазме клетки определяется одно и очень редко два ТГ. Типичное изображение ТГ, описанное в классических работах [3], нами наблюдалось лишь в тех случаях, когда срез проходил перпендикулярно к продольной оси и примерно в центре органеллы (рис. 1, а, б, ж). Тогда оно имело почти правильную округлую или овальную форму размером $0,60 \pm 0,07$ мкм и крайне редко $0,36$ мкм, было ограничено элементарной мембраной, имело электронно-плотную гомогенную перигранулярную часть шириной $0,11 \pm 0,04$ мкм и почти электронно-светлый центр. При прохождении среза по касательной к органелле ТГ имеет округлую,

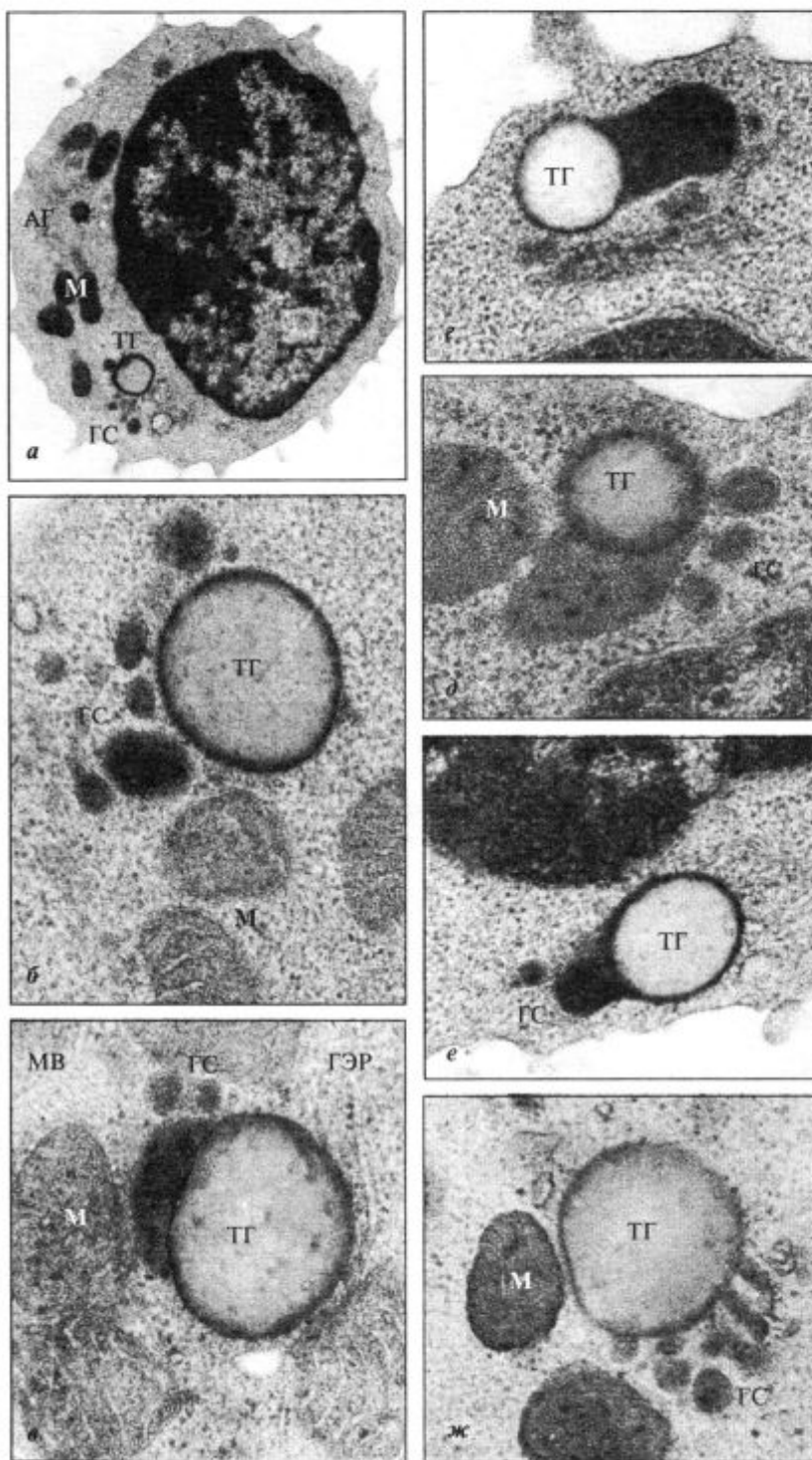


Рис. 1. Ультраструктура тельца Голла в лимфоцитах крови здоровых людей: а — лимфоцит крови здорового человека ($\times 5000$); б–ж — фрагменты лимфоцитов крови здоровых людей, содержащих тельце Голла (б — $\times 29600$; в — $\times 40000$; г — $\times 50000$; д — $\times 33000$; е — $\times 35000$; ж — $\times 31000$); ТГ — тельце Голла; ГС — гранула-спутник; М — митохондрия; ГЭР — гранулярный эндоплазматический ретикулум; МВ — микроволокна

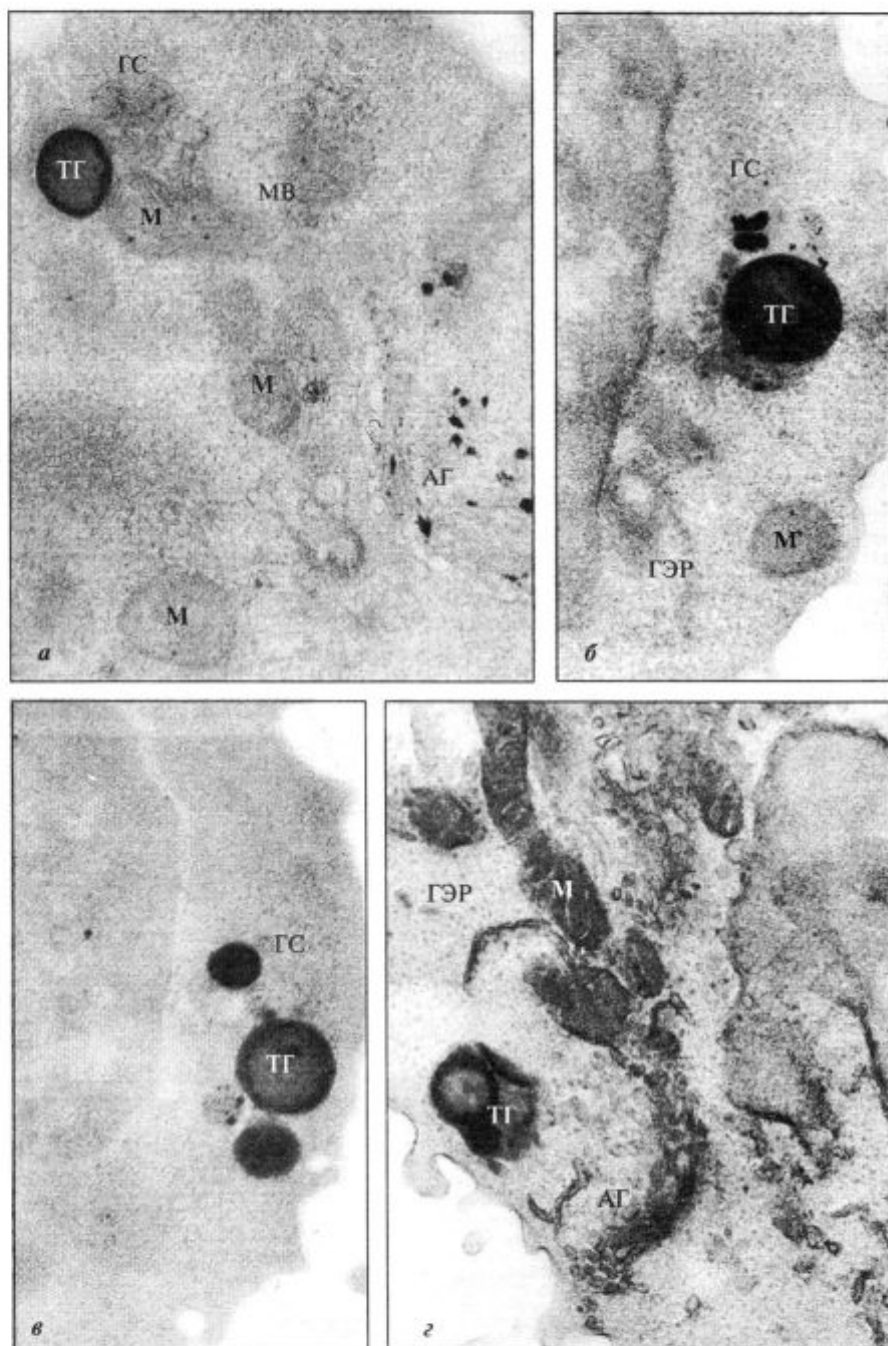


Рис. 2. Ультрахимическое выявление кислой фосфатазы (а, б), пероксидазы (в) и гликогена (г) в лимфоцитах, содержащих тельце Голла, крови здоровых людей (а — $\times 19000$; б — $\times 42000$; в — $\times 22000$; г — $\times 20000$); ТГ — тельце Голла; ГС — гранула спутник; АГ — аппарат Гольджи, М — митохондрия

вытянутую, овальную, эллипсоидную, гантелеподобную или неправильную форму за счет довольно большой гомогенной электронноплотной части (рис. 1, в–е), в которой иногда определяются участки повышенной электронной плотности (рис. 1, з, д). Соотношение этих двух разных по электронной плотности частей варьирует.

При анализе большого количества электронно-микроскопических препаратов нами установлено, что возле ТГ, как правило, присутствуют от 2 до 10 округлых или овальных гранул-спутников разной электронной плотности, образующих вместе с ТГ кластер. Возле кластера всегда можно обнаружить 1–4 митохондрии

конденсированного типа, каналцы гранулярного эндоплазматического ретикулума (ГЭР), скопления микрофиламентов, гранулы гликогена, микротрубочки и многочисленные пузырьки с мелкодисперсным содержимым (рис. 1, в).

При ультрацитохимическом исследовании обнаружено, что в ТГ, отдельных гранулах-спутниках, пузырьках, а также во всем аппарате белкового синтеза (каналцы ГЭР, цистерны комплекса Гольджи (КГ), транспузырьки) выявлялась активность кислой фосфатазы (рис. 2, а, б). Высокая электронная плотность отмечалась в ТГ, а также в большинстве гранул-спутников и при реакции на пероксидазу (рис. 2, в). Несмотря на то, что в контрольных опытах с отсутствием в среде перекиси водорода электронная плотность ТГ значительно ниже, мы все же склонны думать, что повышение электронной плотности в ТГ при реакции на пероксидазу происходит за счет неферментативного окисления или присутствия в ТГ перекисей жирных кислот, поскольку в лимфоцитах активность пероксидазы не выявляется.

Повышенная электронная плотность обнаруживается в ТГ и его гранулах-спутниках и после феррицианид-осмиевой фиксации, что может свидетельствовать о присутствии в его электронно-плотной периферической части гликопротеинов и гликогена (рис. 2, г).

На препаратах, фиксированных феррицианидом осмия, который значительно повышает контраст мембран, нам удалось наблюдать направленную от цистерн КГ к ТГ цепочку транспузырьков (рис. 2, г). Отдельные транспузырьки имели непосредственный контакт с его мембраной. Это дает основание считать, что ТГ является органеллой, где накапливается материал, синтезированный в каналцах ГЭР и прошедший определенные этапы созревания в структурах КГ. Очень близкое расположение каналцев ГЭР и ТГ указывает на то, что не исключена возможность и прямого перемещения синтезированного в каналцах ГЭР материала в ТГ без участия КГ.

Характерной особенностью является также наличие в непосредственной близости возле ТГ гранул-спутников, образующих вместе с ТГ кластер. В гранулах-спутниках, как и в ТГ, определяется активность кислой фосфатазы, повышена электронная плотность при феррицианид-осмиевой фиксации и при реакции на пер-

оксидазу. Иногда нами наблюдался тесный контакт ТГ с гранулами, которые как бы отпочковывались от него (рис. 1, д-ж). Отделение от ТГ электронно-плотных образований, ограниченных элементарной мембраной, наводит на мысль о тесной связи ТГ с гранулами-спутниками, которые, возможно, являются дериватами ТГ (уникальной в этом смысле органеллы). Можно предположить, что в ТГ накапливается синтезированный в аппарате белкового синтеза материал, в нем он «дозревает», а затем по мере необходимости отпочковывается от него в виде гранул. Таким образом, полученные данные наводят на мысль о высокой секреторной активности этих клеток. Возможно допустить, что одним из компонентов этих гранул может быть и ряд цитокинов — интерлейкин ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, интерферон гамма (ИФН-гамма), фактор некроза опухолей (ФНО) и другие, которые секретируются этими лимфоцитами [11].

В настоящее время показано, что субпопуляция CD4⁺ лимфоцитов в свою очередь является функционально неоднородной и состоит из двух типов клеток (Th1 и Th2), которые продуцируют разные виды цитокинов. Так, Th1 клетки секретируют ИЛ-2, ИФН-гамма, ФНО, в то время как Th2 — ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-10 [11–13]. На основании полученных нами данных не представляется пока возможным сделать какое-либо предположение о том, для какого именно из типов CD4⁺ клеток характерно наличие ТГ, т.е. к продукции каких именно цитокинов имеет отношение данная органелла. Возможно, ТГ присутствует в обоих типах CD4⁺ клеток. Ответ на этот важный вопрос связан с большими техническими трудностями и является делом будущего.

Таким образом, проведенными исследованиями установлено, что для определенной популяции малых лимфоцитов с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, принадлежащих к субпопуляции CD4⁺ клеток, характерны особые лизосомоподобные образования — тельца Голла.

Впервые установлено, что ТГ имеет довольно сложное субмикроскопическое строение и вместе с его дериватами — гранулами-спутниками, а также митохондриями, микрофиламентами, каналцами ГЭР и аппаратом Гольджи образует единый функциональный комплекс. ТГ обладает способностью как накапливать

синтезированный в аппарате белкового синтеза материал, так и отделять его в виде ограниченных элементарной мембраной гранул, которые необходимы для реализации специфических функций этого типа лимфоцитов.

Более полная информация об ультраструктуре ТГ, их функции и диагностическом значении может быть получена при их исследовании у больных с различной патологией. Результаты таких исследований будут представлены в следующем сообщении.

SUMMARY. The authors have conducted electron microscopic and ultracytochemical studies of blood lymphocytes of healthy individuals containing Gall bodies (GB) which are typical for CD4⁺ cell subpopulation. It has been established that GB have quite a complex submicroscopic structure and together with its derivatives, granules-satellites, as well as mitochondria, microfilaments, rough endoplasmic reticulum canaliculi, and Golgi complex it forms a unique active functional complex. GB show a high activity of acid phosphatase and positive reaction to glycogen. The data obtained suggest the leading role of GB in the production of cytokines and other biologically active substances.

РЕЗЮМЕ. Проведено електронно-мікроскопічне і ультрацитохімічне дослідження лімфоцитів крові здорової людини, які містять тільця Голла (ТГ), що характерні для субпопуляції CD4⁺ клітин. Встановлено, що ТГ мають доволі складну субмікроскопічну будову і разом з його дериватами — гранулами-супутниками, а також мітохондріями, мікрофіламентами, канальцями ГЕР і апаратом Гольджі утворюють єдиний активний функціональний комплекс. В ТГ виявляється висока активність кислої фосфатази і позитивна реакція на глікоген. Отримані дані дають можливість вважати, що ТГ приймає значну участь в продукції цитокінів і інших біологічно активних речовин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gall E.A. A previously undescribed granule within the lymphocyte // Amer. J. Med. Sci. — 1936. — 191. — P. 380.
2. Bessis M. Blood Smears Reinterpreted. — Springer Inter., 1977. — P. 146–147.
3. Bessis M. Living Blood Cells and Their Ultrastructure. — New York, 1973. — 429 p.
4. Bozdech M.J., Bainton D.F. Identification of α -naphthyl batyrate esterase as a plasma membrane ectoenzyme of monocytes and as a discrete intracellular membrane-bounded organelle in lymphocytes // J. Exp. Med. — 1981. — 153, — № 1. — P. 182–195.
5. Roitt J., Brostoff J., Male D. Immunology. — London, Tokyo: Mosby., 1988. — P. 581.
6. Хоменко Б.М., Грузов М.А., Шляховенко В.С., Лукинов Д.И., Комиссаренко С.В., Зак К.П. Содержание и ультраструктура CD4⁺ лимфоцитов крови здоровых людей и больных сахарным диабетом I типа // Физиол. журн. — 1989. — 35, № 5. — С. 35–37.
7. Velardi A., Grossi C.E., Cooper M.D. A large subpopulation of lymphocytes with T helper phenotype (Leu — 3/T4+) exhibits the property of binding to NK cell targets and granular lymphocyte morphology // J. Immunol. — 1985. — 134, № 1. — P. 58–64.
8. Бутенко З.А., Глузман Д.Ф., Зак К.П., Филатова Р.С., Шляховенко В.А. Цитохимия и электронная микроскопия клеток крови и кроветворных органов. — Киев: Наук. думка, 1974. — 224 с.
9. Bruijn W.C. Glycogen, its chemistry and morphologic appearance in the electron microscope. 1. A modified OsO₄ fixative which selectively contrasts glycogen // J. Ultrastruct. Res. — 1973. — 42, № 1/2. — P. 29–50.
10. Лукишина В.В., Зак К.П. Ультрацитохимическое выявление гликогена в лейкоцитах крови // Лаб. дело. — 1976. — № 5. — С. 268–269.
11. Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. Цитокины. — Киев: Наук. думка, 1998. — 317 с.
12. Kukreja A., MacLaren N.K. Autoimmunity and Diabetes // J. Clin. Endocrin. and Metabol. — 1999. — 84, № 12. — P. 4371–4378.
13. Delves P.J., Roitt I.M. Advances in Immunology: The Immune System // N. Engl. J. Med. — 2000. — 343, № 1. — P. 37–49.

Поступила 20.06.02