

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ И УЛЬТРАЦИТОХИМИЯ ЛИМФОЦИТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ТЕЛЬЦА ГОЛЛА, В КРОВИ БОЛЬНЫХ, СТРАДАЮЩИХ ДИАБЕТОМ, БОЛЕЗНЬЮ ХОДЖКИНА, И ЛИКВИДАТОРОВ АВАРИИ НА ЧАЭС



Изучены субмикроскопические и ультрацитохимические изменения лимфоцитов, содержащих в цитоплазме комплекс тельца Голла, крови больных сахарным диабетом 1-го и 2-го типа, болезнью Ходжкина и ликвидаторов аварии на ЧАЭС. Обнаружено, что для каждой патологии характерны специфические изменения ультраструктуры комплекса тельца Голла, что указывает на его важную роль в функции этого типа лимфоцитов и может быть использовано как дополнительный цитологический критерий при оценке состояния Т-системы иммунитета.

© В. В. АФАНАСЬЕВА, А. К. БУТЕНКО, К. П. ЗАК, 2004

Введение. При электронно-микроскопическом исследовании лимфоцитов крови человека обнаружено, что часть из них содержит в цитоплазме уникальное субмикроскопическое образование, названное в честь его первооткрывателя [1] тельцем Голла (ТГ). В последующем было показано, что многие лимфоциты с ТГ, которое, как правило, окружено гранулами-спутниками, образующими с ТГ кластер или комплекс ТГ, экспрессируют CD4+ антиген, что дало повод считать эту органеллу морфологическим маркером CD4+ клеток или, возможно, одной из ее субпопуляций [2, 3]. В предыдущем нашем сообщении [4] была детально описана ультраструктура комплекса ТГ в лимфоцитах крови здорового человека. Однако в литературе практически отсутствует какая-либо информация о строении комплекса ТГ при патологии у человека. В связи с этим основной целью настоящего исследования явилось описание ультраструктуры комплекса ТГ в лимфоцитах крови человека при различных заболеваниях, когда наблюдается выраженное снижение содержания и изменение функции CD4+ клеток: сахарный диабет, болезнь Ходжкина, воздействие ионизирующего облучения [5–8].

Материал и методы. Исследования проведены у 20 первичных больных сахарным диабетом 1-го типа (СД1Т), 20 больных сахарным диабетом 2-го типа (СД2Т), 10 больных болезнью Ходжкина (БХ) и 20 ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС. Контролем служила кровь 20 первичных доноров.

Выделенную из гепаринизированной венозной крови лейкоцитарно-тромбоцитарную клеточную взвесь фиксировали 2,5%-ным глутаральдегидом («Sigma») на 0,1 М какодилатном буфере («Sigma»), постфиксировали 1 % OsO₄ на том же буфере и заключали в аралдит («Fluka»). Активность кислой фосфатазы выявляли свинцовым методом [9].

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

Результаты исследований и их обсуждение. При исследовании лимфоцитов крови первичных больных СД1Т было обнаружено, что ТГ у них по сравнению со здоровыми лицами (рис. 1, а, б)

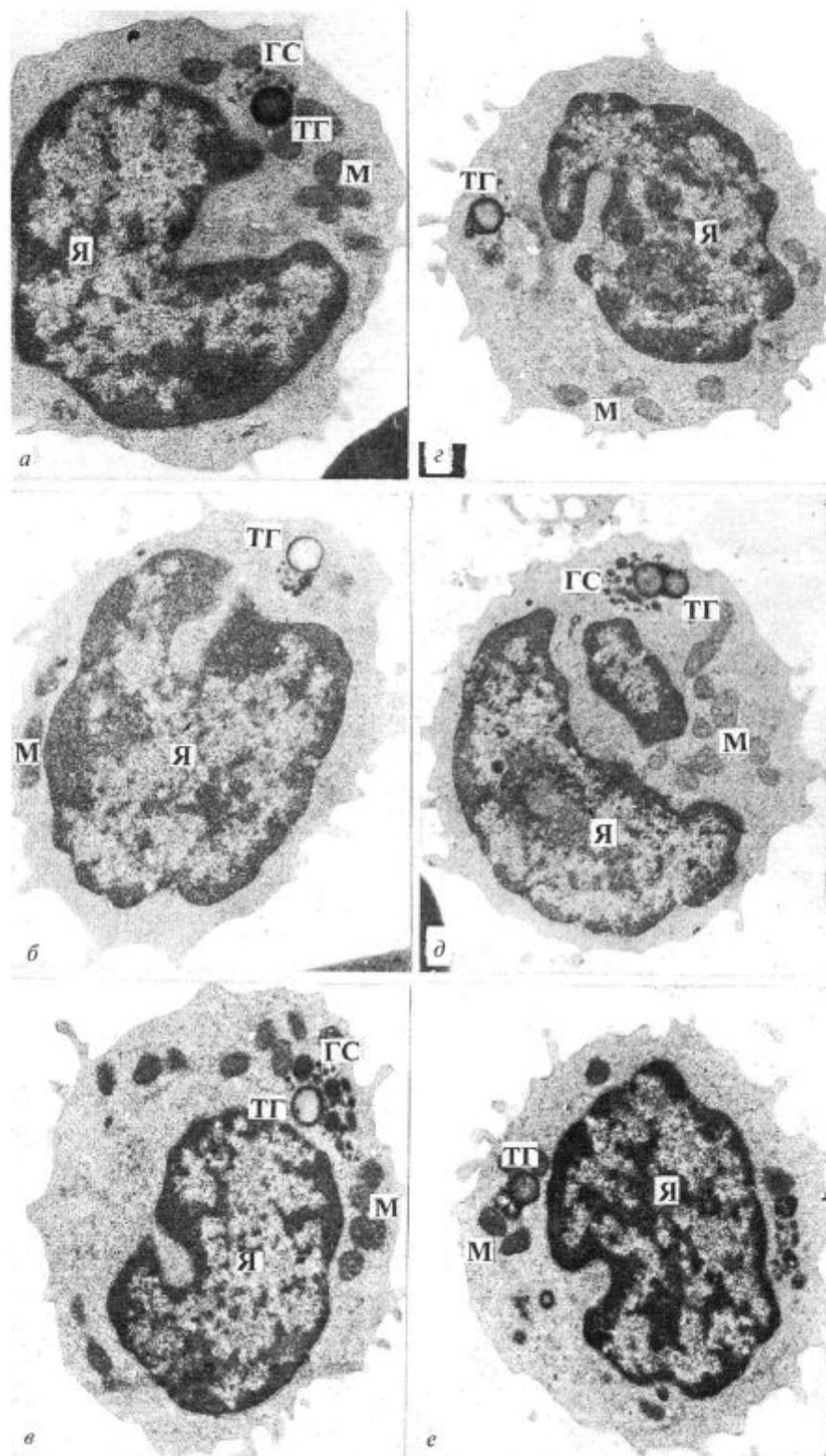


Рис. 1. Ультраструктура комплекса тельца Голла в лимфоцитах крови здорового человека (*а, б*), больного СД1Т (*в*), СД2Т (*г, д*) и ликвидатора аварии на ЧАЭС (*е*): *а* — $\times 9500$; *б* — $\times 8300$; *в* — $\times 10\,000$; *г* — $\times 9000$; *д* — $\times 10000$; *е* — $\times 10000$. ТГ — тельце Голла; ГС — гранула-спутник; М — митохондрия, Я — ядро

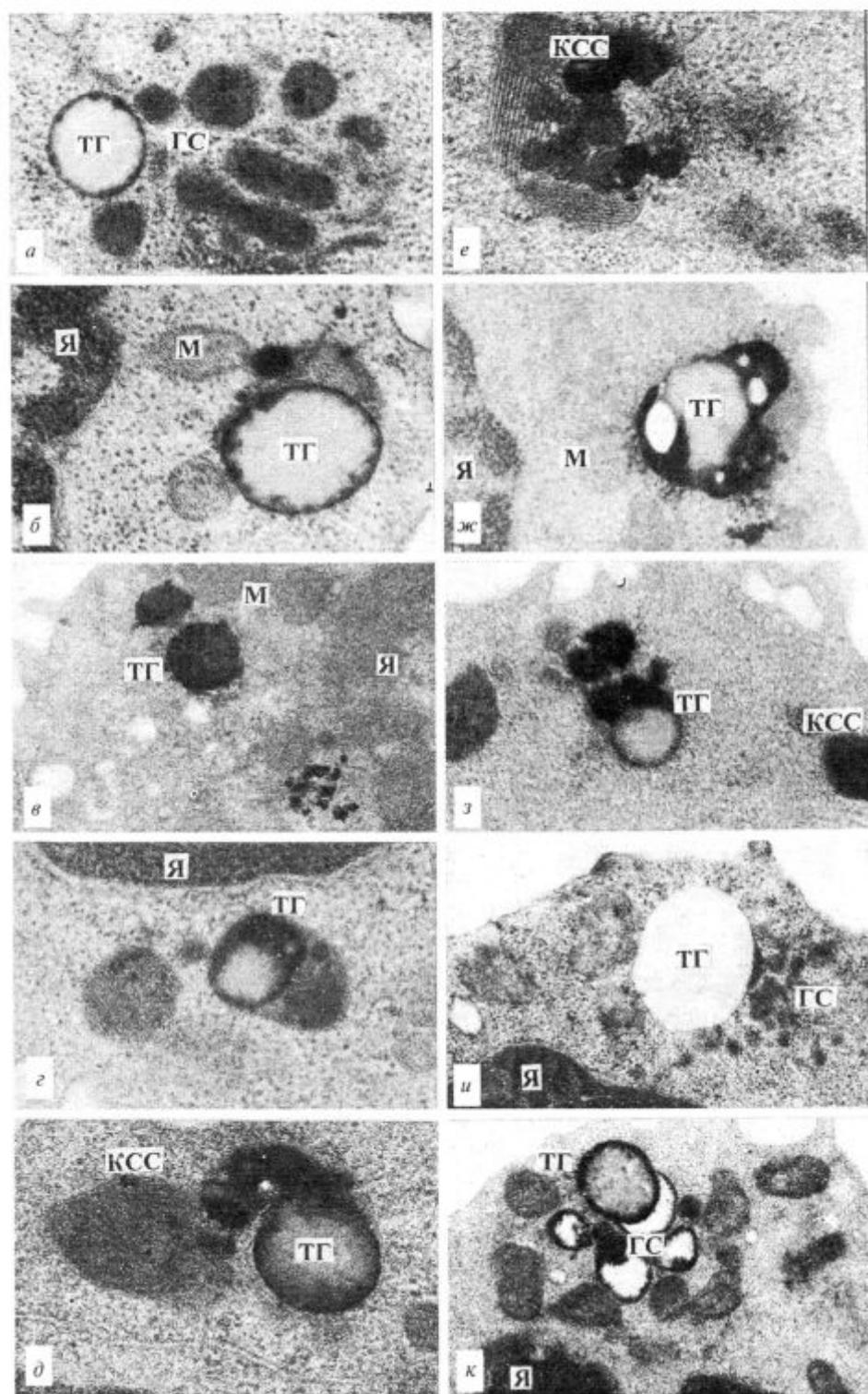


Рис. 2. Фрагменты лимфоцитов, содержащих комплекс тельца Голла, крови больных СД1Т (а, б), кислой фосфатаза в тельце Голла лимфоцита крови больного СД1Т (в), больных СД2Т (г–е), страдающих болезнью Ходжкина (ж, з) и ликвидаторов аварии на ЧАЭС (и, к); а – ×46000; б – ×30000; в – ×26000; г – ×22500; д – ×48000; е – ×47000; ж – ×44000; з – ×30000; и – ×16000; к – ×16000. ТГ – тельце Голла; ГС – гранула-спутник; Я – ядро; КСС – кристаллоид-содержащая структура

имеют несколько большие размеры ($0,66 \pm 0,06$ мкм, в норме — $0,60 \pm 0,07$ мкм), чаще всего узкий электронно-плотный ободок, нередко более просветленное содержимое и окружены большим количеством — до 15 (в норме — до 10) гранул-спутников (рис. 1, в и 2, а). В отдельных случаях электронно-плотное содержимое в отличие от нормы располагается по всему периметру мембранны ТГ в виде хлопьевидных скоплений (рис. 2, а, б). В ТГ большинства лимфоцитов обнаруживается высокая активность кислой фосфатазы (рис. 2, в). Все это наводит на мысль о значительном изменении функции лимфоцитов, содержащих ТГ при СД1Т. Проведенные нами исследования в значительной мере согласуются с последними работами [10, 11], указывающими на важную роль CD4+ клеток в патогенезе СД1Т. Показано, что при аутоиммунном процессе, приводящем к этому заболеванию, выделяется интерлейкин 15 (хемоаттрактант), который приводит к повышенной миграции функционально активных CD4+ клеток в островки Лангерганса поджелудочной железы, где они продуцируют ряд продиабетических цитокинов: интерлейкин-1 бета (ИЛ-1 бета), фактор некроза опухолей альфа (ФНО-альфа), интерферон-гамма (ИФН-гамма), которые приводят к апоптозу и деструкции бета-клеток [12, 13].

При исследовании ультраструктуры лимфоцитов крови больных СД2Т было установлено, что ТГ у них в отличие от СД1Т чаще всего имеют небольшие размеры ($0,44 \pm 0,04$ мкм), неправильную форму с эксцентрично расположенной электронно-светлой частью и несколькими округлыми очагами повышенной электронной плотности в гомогенно-плотном матриксе (рис. 1, г и 2, г). Количество гранул-спутников очень непостоянно и колеблется от 2 до 16. По сравнению с лимфоцитами крови здоровых людей и больных СД1Т в кластере часто обнаруживаются два ТГ. Возле ТГ нередко видны кристаллоид-содержащие или тубуловезикулярные структуры (рис. 2, д, е). Нередко определяются спаренные ТГ, окруженные множеством мелких электронно-плотных гранул (рис. 1, д). Таким образом, у больных СД2Т субмикроскопическое строение ТГ отличается от аналогичного показателя как у здоровых людей, так и больных СД1Т, что, вероятно,

связано как с особенностями патогенеза СД2Т, так и с изменением спектра продуцируемых цитокинов, различными субпопуляциями CD4+ клеток.

Несколько другие особенности ультраструктуры комплекса ТГ были обнаружены при исследовании лимфоцитов крови больных БХ, у которых, как нами сообщалось ранее [14, 15], значительно уменьшено абсолютное и относительное количество CD4+ клеток. ТГ при БХ имеет очень небольшие размеры ($0,42 \pm 0,05$ мкм). Иногда наблюдается его вакуолизация (рис. 2, ж) либо отделение в цитоплазму неограниченных мембраной шарообразных электронно-плотных образований (рис. 2, з). Гранулы-спутники, как правило, отсутствуют. Как и у больных СД2Т, возле ТГ нередко определяются от одного до трех больших угловатых гранул с кристаллоид-подобной структурой матрикса. Таким образом, у больных БХ одновременно с очень низким содержанием CD4+ клеток в крови отмечается значительное изменение строения ТГ, что указывает на нарушение функциональной полноценности этой субпопуляции клеток или одного из ее подтипов. Полученные данные — первое цитологическое подтверждение иммунологических работ, в которых показано, что БХ является типичным иммунодефицит-ассоциированным заболеванием [6]. Интересно также отметить, что, как показали наши предыдущие исследования [15], у больных БХ, вышедших в гематологическую и цитогенетическую ремиссию после терапии интерфероном альфа, происходит восстановление ультраструктуры комплекса ТГ, что подтверждает специфичность его изменения при этом заболевании.

У ликвидаторов аварии на ЧАЭС, получивших дозу облучения от 50 до 100 сГр, определяются два типа измененных ТГ. В одних случаях оно значительно увеличено в размерах и выглядит как огромная ($0,87 \pm 0,08$ мкм) электронно-прозрачная вакуоль с остатком электронно-плотного содержимого, окруженная множеством очень мелких гранул-спутников (рис. 2, и). В других случаях ТГ имеет небольшие размеры, и возле него видны одна или несколько набухших гранул-спутников, в которых обнаруживается хлопьевидно-клочковатое содержимое (рис. 1, е и 2, к). Активность

кислой фосфатазы значительно снижена и выявляется только в единичных клетках.

Полученные данные согласуются с проведенными у этой же группы ликвидаторов исследованиями, в которых показано значительное нарушение Т-клеточного иммунитета [8]. Следовательно, можно предположить, что обнаруженные нами изменения ультраструктуры комплекса ТГ являются одним из морфологических проявлений сложных нарушений иммунитета при облучении.

Таким образом, проведенные исследования выявили значительные изменения субмикроскопической организации комплекса ТГ в лимфоцитах крови больных с различной патологией по сравнению со здоровыми людьми, причем для каждого заболевания (СД1Т, СД2Т, БХ) и в том числе воздействия радиации характерно специфическое строение комплекса ТГ, образуемого ТГ и его гранулами-спутниками. Полученные электронно-микроскопические и ультрацитохимические данные дают право полагать, что этот комплекс, являющийся неотъемлемой структурой для одного из видов лимфоидных клеток, как полагают, CD4+ лимфоцитов, имеет прямое отношение к образованию и накоплению цитокинов. Как известно, популяция CD4+ клеток состоит из двух субпопуляций (Th1 и Th2 клеток), которые обладают неодинаковой функцией и продуцируют цитокины различного типа. Так, Th1 клетки причастны к секреции противовоспалительных цитокинов (интерлейкин-2, ИФН-гамма, ФНО-альфа), в то время как Th2 клетки секретируют антивоспалительные цитокины (интерлейкин-4, интерлейкин-10) [16, 18]. Естественно, что решение вопроса о том, к продукции каких именно цитокинов имеет отношение комплекс ТГ, дело будущего.

SUMMARY. Submicroscopic and ultracytochemical changes in lymphocytes containing Gall body complex in the cytoplasm, have been studied in the blood of patients with type 1 and 2 diabetes mellitus, Hodgkin disease, and clean-up workers of the Chernobyl accident. It has been shown that each pathological state was characterized by specific changes in the ultrastructure of Gall body complex, that pointed out its important role in the function of this type of lymphocytes and may be used as an additional cytological criterion in the estimation of T-immunity status.

РЕЗЮМЕ. Вивчено субмікроскопічні і ультраци-
тохімічні зміни лімфоцитів, які містять в цитоплазмі
комплекс тільця Голла, крові хворих на цукровий діа-
бет 1-го і 2-го типу, з хворобою Ходжкіна та ліквідато-
рів аварії на ЧАЕС. Встановлено, що для кожної пато-
логії характерні специфічні зміни ультраструктури
комплекса тільця Голла, що вказує на його важливу
роль у функції цього типу лімфоцитів і може бути ви-
користано як додатковий цитологічний критерій при
оцінці стану Т-системи імунітету.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gall E.A. A previously undescribed granule within the lymphocyte // Amer. J. Med. Sci. — 1936. — **191**. — P. 380.
 2. Хоменко Б.М., Грузов М.А., Шляховенко В.С., Лукинов Д.И., Комисаренко 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.
 3. 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.
 4. Афанасьева В.В., Зак К.П., Бутенко А.К. Электронная микроскопия и ультрацитохимия лимфоцитов, содержащих тельца Голла, крови здоровых людей // Цитология и генетика. — 2003. — **37**, № 1. — С. 56–60.
 5. Pickup J.C., Crook M.A. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? // Diabetologia. — 1998. — **41**, № 10. — P. 1241–1248.
 6. Canellos G.P., Lister T.A., Sklar J.L. The Lymphomas. — Philadelphia : W.B. Sanders Co., 1998. — 581 р.
 7. Бутенко А.К. Иммунофенотип лимфоцитов крови при радиационно-ассоциированной болезни Ходжкина // Доп. НАН України. — 2000. — № 8. — С. 192–194.
 8. Зак К.П., Михайловская Э.В., Страшок Н.В., Бутенко З.А., Грузов М.А., Афанасьева В.В., Шляховенко В.С., Семёнова Т.А., Куликовская А.В. Гематологический и иммунологический мониторинг ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС через 5–12 лет // Укр. мед. часопис. — 2000. — № 3(17). — С. 26–31.
 9. Бутенко З.А., Глузман Д.Ф., Зак К.П., Филатова Р.С., Шляховенко В.С. Цитохимия и электронная микроскопия клеток крови и кроветворных органов. — Київ : Наук. думка, 1974. — 224 с.
 10. Зак К.П., Малиновская Т.Н., Тронько Н.Д. Іммунитет у дітей, больных сахарным диабетом. — Київ : Книга плюс, 2002. — 111 с.
 11. Roep B.O. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: From cause to cure // Diabetologia. — 2003. — **46**. — P. 305–321.
 12. Hussain M.J., Maher J., Warnock T. et al. Cytokine overproduction in healthy first degree relatives of

■ Электронная микроскопия и ультрацитохимия лимфоцитов... ■

- patients with IDDM // Diabetologia. — 1998. — **41**, № 3. — P. 343–349.
13. Kukreja A., Cost G. Marker J. et al. Multiple immuno-regulatory defect in type-1 diabetes // J. Clin. Invest. — 2002. — **109**, № 1. — P. 131–140.
14. Бутенко А.К. Иммунофенотип лимфоцитов крови у больных с неходжкинскими лимфомами // Укр. мед. часопис. — 2000. — №4(18). — С. 119–121.
15. Butenko A., Afanasyeva V., Zak K. Interferon- α therapy restars the abnormal structure of gall bodies in CD 4+ blood lymphocytes of patients with Hodgkin disease // Proc. Soc. 14 Intern. Congr. Anti-Cancer. Treat. — Paris. 1–4 Feb., 2003. — P. 284.
16. Возианов А.Ф., Зак К.П., Бутенко А.К. Цитокины: биологические и противоопухолевые свойства. — К. : Наук. думка, 1998. — 312 с.
17. Kukreja A., McLaren N. Autoimmunity and diabetes // J. Clin. Endocrinol. a Metabolism. — 1999. — **84**, № 12. — P. 4371–4378.
18. Delves P.J., Roitt I. The immune system // New Engl. J. Med. — 2000. — **343**, № 1. — P. 37–49.

Поступила 28.10.03