

МОРФОЛОГИЯ

УДК 611.018+616—091.8

Л. А. Авакян, Э. С. Акопджанян, А. А. Агабабова, А. Г. Ананян,
А. Г. Саакян

Морфогистохимическая оценка лимфоцитов в методике изучения
выделения лимфокинов

(Представлено академиком АН Армении А. Л. Галояном 22/X 1990)

В настоящее время лимфокины рассматриваются в качестве биологически активных веществ, сфера влияния которых распространяется на многие интегративные системы организма.

Способы выделения и идентификация продуктов жизнедеятельности лимфоцитов основываются преимущественно на биохимическом, иммунологическом тестировании. При этом совершенно не учитываются аспекты морфофункционального состояния популяции лимфоцитов, ответственных за секрецию биологически активных веществ. В то же время подобные исследования являются необходимым компонентом многогранной схемы получения лимфокинов, поскольку от чистоты полученной фракции во многом зависят их биологические эффекты.

Из поля зрения исследователей выпали такие важные этапы, как процессы стерилизации и определения морфо-функционального состояния исходных клеток в инкубационной среде. Именно поэтому представляется необходимым в каждом конкретном случае осуществление комплекса ультраструктурных, гистохимических исследований лимфоцитов, поскольку продукты распада ультраструктурных и гидролитических ферментов лизосомального аппарата могут оказывать побочное влияние на изучаемые биологические объекты.

Методологические аспекты выделения и гель-фильтрационной характеристики продуктов жизнедеятельности лимфоцитов детально изложены в наших предыдущих исследованиях (1).

В настоящем исследовании приводятся сведения о морфо-функциональной, ультраструктурной характеристике популяции Т-лимфоцитов до и после 6-часовой инкубации в питательной среде 199.

Для этой цели готовились из осадка мазки, которые окрашивали методом азосочетания на предмет определения кислой фосфатазы (КФ), активность которой подсчитывали на цитофотометре.

Активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) определяли по методу Нахласа (2).

При окраске мазков азур-2-эозином существенных структурных изменений после инкубации в клетках лимфоцитарного ряда не обнаружено.

Как правило, целостность ядерноцитоплазматических мембран сохранялась. Ядро четко контурировалось и характеризовалось умеренным содержанием хроматина. Следует отметить, что, как правило, цитоплазма клеток выглядела несколько набухшей, характеризовалась умеренным содержанием базофильного материала, который распределялся по всей цитоплазме. Встречались единичные оптически светлые вакуолизированные участки. Признаки дистрофии и распада наблюдались лишь в единичных лимфоцитах. Результаты отображены в таблице.

Активность СДГ, ЛДГ и КФ в условных единицах поглощения в тимоцитах крыс

Фермент	До инкубации	После 6 ч инкубации
КФ	$9,89 \pm 1,1$	$2,3 \pm 1,2$ $t = 1,0$
СДГ	$7,3 \pm 2,5$	$7,8 \pm 0,21$ $t = 0,2$
ЛДГ	$5,7 \pm 2,5$	$1,7 \pm 0,2$ $t = 1,6$

До выделения тимоцитами лимфокинов клетки не разрушены. КФ, в основном, выявляется в крупных клетках, но местами зерна видны и вне клеток.

После выделения лимфокинов клетками в мазках видны разрушенные клетки, отмечается кариолизис, активность КФ снижается, хотя статистически это не подтверждается.

Активность СДГ в тимоцитах до и после выделения лимфокинов почти не меняется. Активность же ЛДГ в тимоцитах снижается, хотя статистически не достоверно.

Таким образом получается, что ферментативная активность сильно возрастает в момент подготовки клетки к выделению лимфокинов, после выделения лимфокинов активность фермента снижается.

При изучении ультраструктурного строения выделенных в среде 199 тимоцитов мы нашли целесообразным выделить три этапа:

- 1) ультраструктура клетки до выделения лимфокинов—контроль;
- 2) ультраструктура клетки после выделения лимфокинов;
- 3) ультраструктура клетки конечного этапа методики после получения лимфокинов и последующего центрифугирования.

Контрольные и инкубированные тимоциты фиксировали 2,5%-ным раствором глютаральдегида, приготовленным на 0,1 М какодилатном

или фосфатном буферах (рН 7,2—7,4), от 2 до 20 ч. Затем центрифугировали при 1500 об./м 10 мин. и осадок, содержащий тимоциты, дофиксировали 1%-ной осмиевой кислотой, приготовленной теми же буферами. Материал обезвоживали и заливали в смесь эпона и аралдита. Блоки резали на ультратоме фирмы „Reichert Jung“. Срезы контрастировали на сетках, смотрели с помощью электронного микроскопа Tesla BS—613.

Контрольные тимоциты—лимфоциты (рис. 1) хорошо сохранены, имеют округлые или овальные ядра с четкими контурами, занимающие центральное или несколько эксцентричное положение в клетке. Ядра богаты хроматином, который сконцентрирован на периферии. Светлая в центральной части карноплазма в некоторых тимоцитах содержит хорошо развитое ядрышко. Цитоплазма светлая, бедна органоидами. Однако наблюдается присутствие значительного количества рибосом, часть которых свободно и равномерно располагается в гиалоплазме.

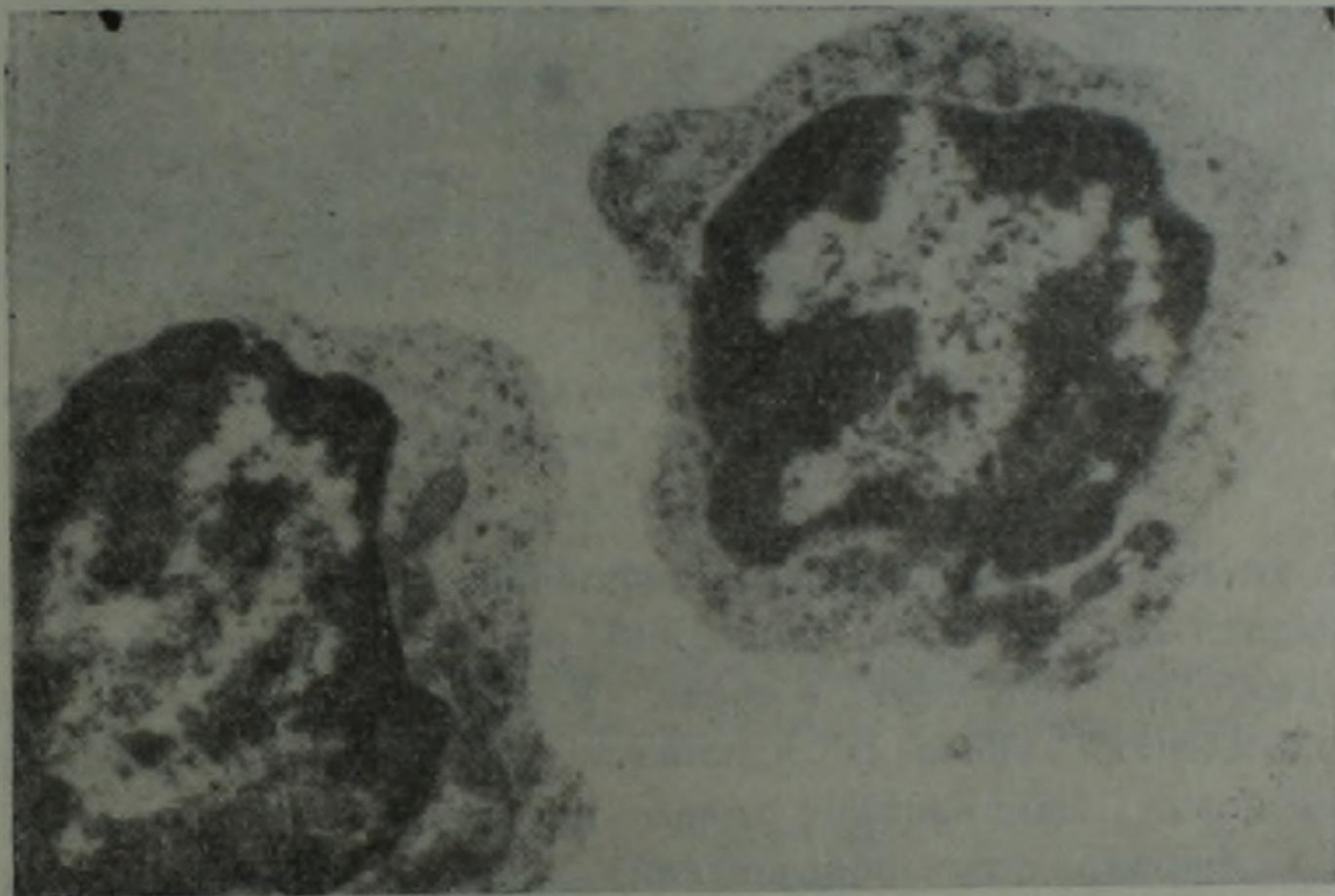


Рис. 1. Ультраструктура контрольных лимфоцитов Ув. 22 600

Некоторые рибосомы связаны с мембранами эндоплазматической сети, которая представлена единичными удлиненными трубочками. Наблюдается слабое развитие комплекса Гольджи и эндоплазматической сети. Встречаются тимоциты, содержащие центриоли. Митохондрии разбросаны или образуют группу, имеют овальную или удлиненную форму и матрикс—с разной степенью осмиофильности. Наблюдается наличие в цитоплазме азурофильных гранул. По сравнению с малыми лимфоцитами, в больших наблюдается значительная насыщенность цитоплазмы структурными компонентами: митохондриями, рибосомами, хорошо развитым комплексом Гольджи.

Результаты электронномикроскопического исследования нормально отмытого тимocyта выявили нормальную клетку с выраженными ультраструктурными элементами.

Во втором этапе рассматривали ультраструктуру клетки после 6-часовой инкубации при $t 37^{\circ}$; было выявлено четкое набухание значительного количества клеток и их органелл. Причем набухание иногда касалось части тимocyта (рис. 2,а), а иногда охватывало его полностью (рис. 2,б), вовлекая также ядро. У всех набухших клеток нарушена целостность плазматической мембраны, наблюдается «вымывание» и просветление цитоплазмы.

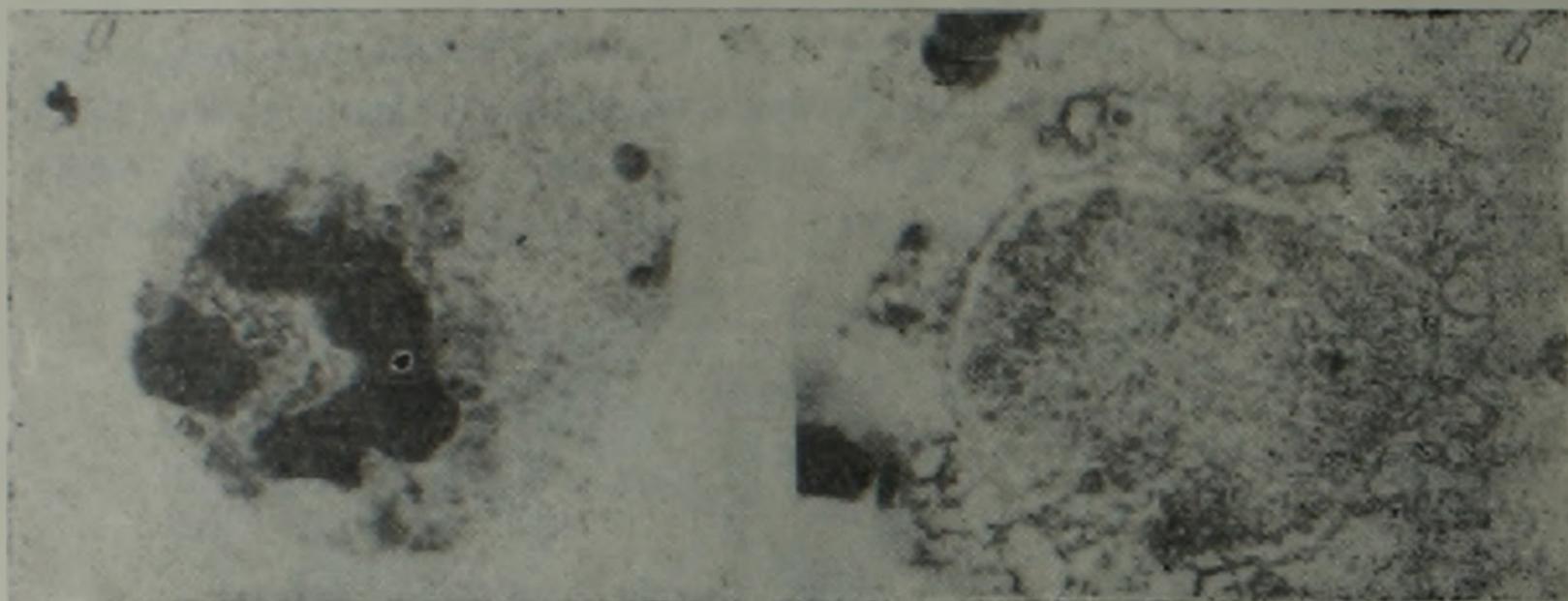


Рис. 2. Частичное (а) и тотальное (б) набухание лимфоцитов после 6-часовой инкубации. Ув. 22 600

Все клеточные органоиды, состоящие из мембран (митохондрии, ретикулярная сеть, комплекс Гольджи) резко набухают, часть органоидов свободно «плавают» в среде. У значительной части клеток (рис. 2,б) ядерная оболочка удаляется от хроматина, расширяется перинуклеарное пространство, ядро просветляется, хроматин, состоящий из фибриллярных образований, диффузно заполняет ядерное пространство. Одновременно наблюдаются также тимocyты, почти не измененные.

Согласно методике, после центрифугирования лимфокины остаются в надосадочной части, а клетки, выполнившие свою функцию продуцента, выпадают в осадок. Тимocyты (рис. 3), выпавшие в осадок, в основном состоят из ядер и части цитоплазмы, окружающей ядро. Ядро содержит большое скопление более осмиофильного хроматина, чем у интактных тимocyтов. Ядерная оболочка этих клеток разрушена, остатки цитоплазмы представлены резко набухшими и измененными мембранозными органоидами.

Следовательно, клетка в момент выделения лимфокинов мобилизует все свои внутренние ресурсы, активизирует обменные процессы, а после выделения лимфокинов происходит отчасти нарушение целост-

ности клетки и ее функций, что наглядно выявлено и электронномикроскопически, и на примере снижения активности ферментов.

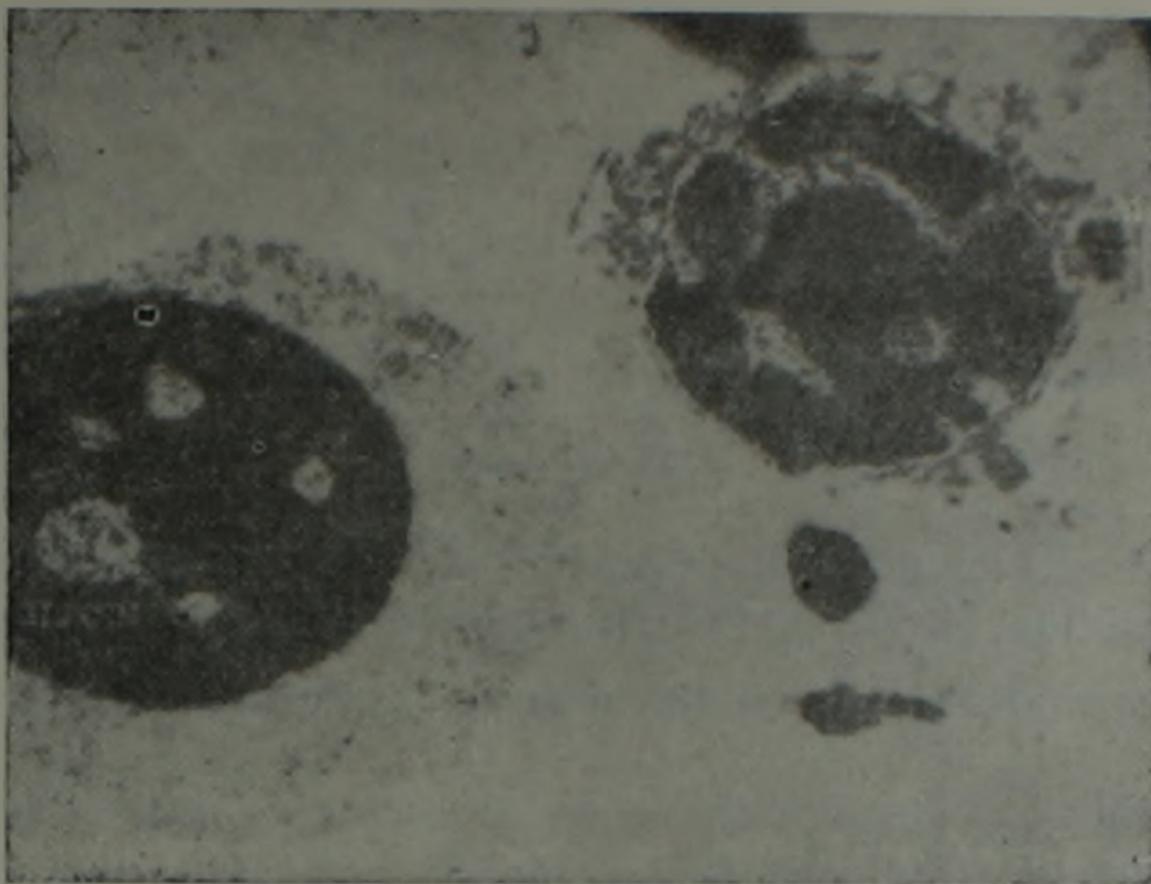


Рис. 3. Субмикроскопическое строение лимфоцитов после получения лимфокинов и последующего центрифугирования. Ув. 22 600

Ереванский государственный медицинский институт

Լ. Հ. ԱՎԱԳՅԱՆ, Է. Ս. ՀԱԿՈՐՋԱՆՅԱՆ, Ա. Ա. ԱՂԱՐԱՐՈՎԱ,
Ա. Հ. ԱՆԱՆՅԱՆ, Ա. Հ. ՍԱՀԱԿՅԱՆ

Լիմֆոկինների անջատման ուսումնասիրության մեթոդում
լիմֆոցիտների մորֆոհիստոքիմիական գնահատականը

Հիտազոտվել են ուրցագեղձից մեկուսացված լիմֆոցիտները և նրանց կենսազործունեության արգասիքները՝ լիմֆոկինները: Հիստոքիմիական մեթոդները լիմֆոցիտներում ի հայտ են բերել կրեբսի ցիկլի օքսիդացման վերականգնման ֆերմենտների (սուկցինատ-դեհիդրոգենազա և լակտատ-դեհիդրոգենազա) ակտիվության ջարձրացում լիմֆոկինների անջատումից առաջ և իջնում՝ լիմֆոկինների անջատումից հետո:

Էլեկտրոնային մանրադիտակային ուսումնասիրությամբ հայտնաբերվել են լիմֆոցիտների ուլտրակառուցվածքի փոփոխություններ լիմֆոկինների անջատումից հետո:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

¹ А. В. Зильфян и др., ДАН АрмССР, т. 89, № 41 (1989). ² S. S. Nachlas, S. S. Karmarkar, J. Biophys. Biochem., Cytol., v. 4, № 467 (1958).