

УДК 537.533.35:615.365.631

Л. И. Барченко

### ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКОЕ И ЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ РЕАКЦИИ ЛИЗОСОМ И КОМПЛЕКСА ГОЛЬДЖИ НА ДЕЙСТВИЕ МАЛЫХ ДОЗ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ

В литературе имеется большое количество данных об эффекте действия различных цитотоксических сывороток на функцию отдельных органов и организма в целом. В то же время механизм действия этих сывороток изучен в значительно меньшей степени. В первую очередь это касается механизма стимулирующего действия на клетки малых доз цитотоксических сывороток. Детали этого интимного механизма достаточно сложны и многие его аспекты неизвестны до сих пор. С каждым годом накапливается все больше фактов о роли лизосом в различных физиологических и патологических процессах в организме. Полученные в последние годы данные свидетельствуют об участии лизосом в ряде иммунных реакций. Так например известно, что разрушение антигена в лизосомах макрофагов является необходимым условием для последующего образования антител, выявлена определенная роль лизосом в развитии аутоиммунных реакций и участие ферментов лизосом в развитии процесса анафилаксии [11, 13, 19].

Мы изучали первичную реакцию лизосомного аппарата и функционально связанного с ним комплекса Гольджи в первые часы и сутки после воздействия на клетки малых (стимулирующих) доз антител цитотоксических сывороток, т. е. фактически в процессе развития реакции антиген-антитело, которая лежит в основе всех реакций иммунитета. Описанные в литературе результаты аналогичных исследований получены в основном с использованием больших доз цитосывороток.

Для того, чтобы иметь возможность косвенно судить о функциональном состоянии изучаемых структур мы сочетали электронномикроскопическое исследование с цитохимическим изучением активности ферментов-маркеров лизосом (кислой фосфатазы и кислой рибонуклеазы) и комплекса Гольджи (тиаминпирофосфатазы). Исследования проведены на клетках культур тканей, что давало возможность непосредственно наблюдать реакцию клеток на действие антител в определенные промежутки времени.

#### Методика исследований

Культуры тканей семенника половозрелых крыс 4—5 мес возраста культивировали во флаконах Карреля на питательной среде, которая состояла из раствора Тироде, плазмы крови гуся и эмбрионального экстракта. Антитестиккулярную цитотоксическую сыворотку (АТЦС), содержащую антитела специфичные к ткани семенника, получали посредством иммунизации кроликов водно-солевым экстрактом ткани семенника крыс. Титр антител устанавливали в реакции связывания комплемента. В исследованиях использованы сыворотки с титрами 1:320—1:400. Цитотоксическую сыворотку добавляли в жидкую питательную среду культур и дозировали в процентах от общего количества жидкой питательной среды во флаконе. Для электронномикроскопических ис-

следований культуры тканей фиксировали последовательно глутаральдегидом и 1% раствором осмиевой кислоты, при pH 7,3. Затем тотальные препараты культур проводили через спирты возрастающей крепости, ацетон и погружали в эпоксидную смолу аралдит-М. Подходящий участок для приготовления ультратонких срезов выбирали при предварительном изучении полутонких срезов, полученных с больших участков зоны роста и окрашенных 1% раствором парафенилендиамина. Срезы для электронной микроскопии толщиной 600—800 Å делали на ультрамикротоме LKB-8800 и контрастировали гидроокисью свинца по методу Рейнольдса [22]. Просмотр и фотографирование препаратов осуществляли с помощью электронного микроскопа высокого разрешения типа В-5-513-А. Активность фермента кислой фосфатазы изучали с помощью световой микроскопии на тотальных препаратах культур с выявлением активности фермента по [3] и электронногистохимически с постановкой реакции по [17]. Гистохимическую реакцию на тиаминпирофосфатазу для световой микроскопии проводили по [3], а кислую рибонуклеазу выявляли по [6].

Исследования проводили по следующей схеме: интактные культуры тканей семенника выращивали на протяжении 7—8 сут до образования хорошо развитой зоны роста. Затем в питательную среду культур добавляли АТФС в указанной дозе, флаконы с культурами помещали в термостат при 37° С и затем фиксировали через 1, 3, 6, 24, 48 и 72 ч. В питательную среду контрольных культур добавляли в той же дозе сыворотку крови неиммунизированного кролика (НКС). Часть культур оставляли интактными.

Различные типы лизосом на полученных нами электроннограммах идентифицировали посредством сравнения с [5, 11].

### Результаты исследований и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что реакции клеток на действие антител цитотоксической сыворотки, примененной в малой дозе, развиваются на субклеточном уровне. Через 1 ч после начала воздействия антител в клетках появляются образования величиной 0,5—1,3 мкм, ограниченные однослойными мембранами (рис. 1, а). Внутреннее содержимое их электроннопрозрачно с ободком более электронноплотного вещества по краю. Гораздо реже встречаются образования с электронноплотным содержимым — зернистым или гомогенным. Эти структуры располагаются чаще в перинуклеарной зоне вблизи комплекса Гольджи, количество их в клетках сильно варьирует. Структуры подобного характера строения и в таком количестве не встречаются в интактных клетках культур тканей семенника и в клетках контрольных культур после действия НКС. Поскольку при электронногистохимической реакции такие структуры не обнаруживали активности кислой фосфатазы, то можно предположить, что они являются прелизосомами (согласно классификации Де Дюва, приведенной в [11]), которые содержат пиноцитированный материал. Спустя 3 ч эти структуры встречались лишь в небольшом количестве клеток и в дальнейшем сроки исследования не наблюдались.

При световой микроскопии активность кислой фосфатазы в клетках подопытных культур через 1 и 3 ч после начала воздействия антител была повышенной. Это выражалось в увеличении количества окрашенных гранул, соответствующих местам локализации фермента в лизосомах. Обращает также внимание нередко наблюдаемая в клетках подопытных культур интенсивная реакция на кислую фосфатазу в части перинуклеарной зоны, соответствующей месту локализации комплекса Гольджи в этих клетках (рис. 2, а, б). В течение первых часов после начала воздействия антител в клетках наблюдается усиление активности фермента кислой рибонуклеазы, также локализованного в лизосомах (рис. 2, в, г). При электронномикроскопическом исследовании обнаружено, что в перинуклеарной зоне вокруг места расположения комплекса Гольджи в течение первых шести часов после начала воздействия антител количество первичных лизосом увеличивается в сравнении с контрольными культурами. В дальнейшем в клетках коли-

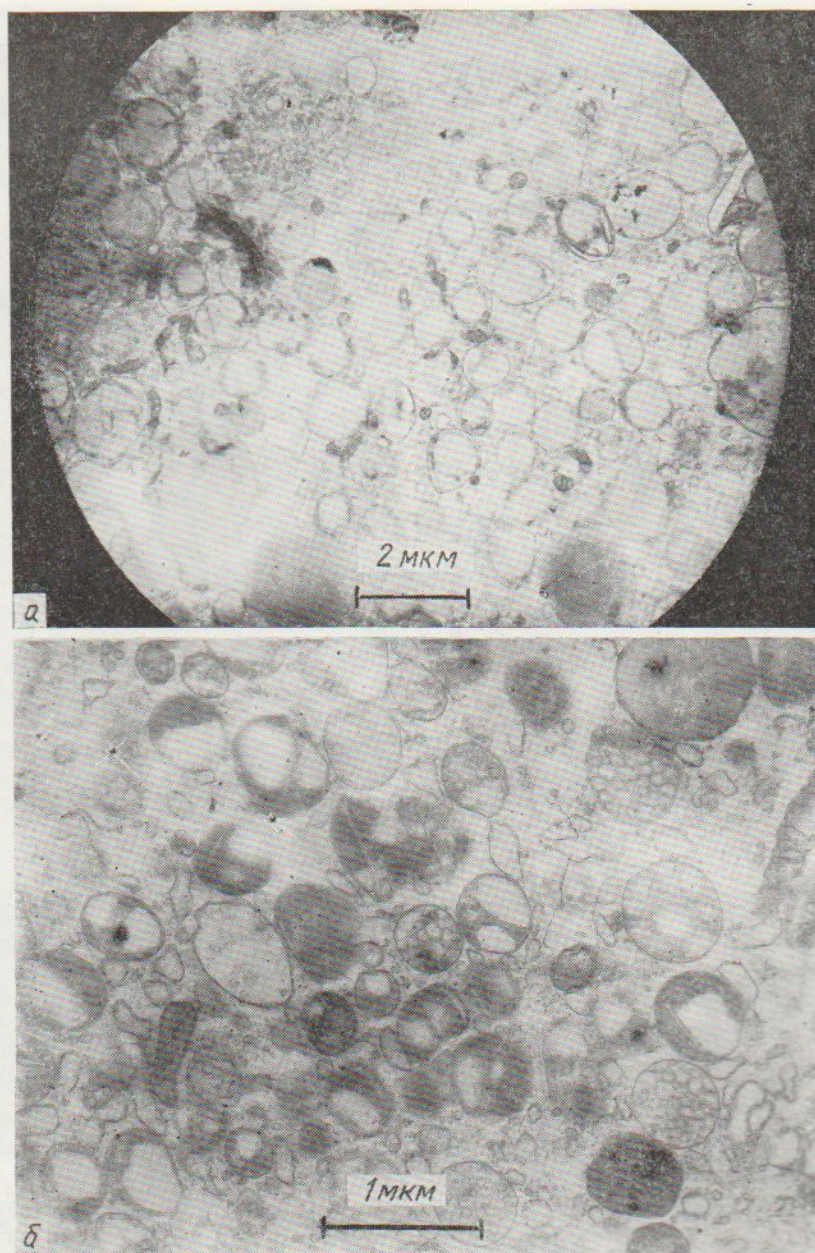


Рис. 1. Лизосомы разных типов в цитоплазме клеток после воздействия антител.

*a* — прелизосомы в цитоплазме клетки через 1 ч после контакта клеток с антителами;  
*б* — скопление лизосом типа постлизосом или остаточных телец в эктоплазматической зоне клетки через 48 ч после начала воздействия антител.

чество лизосом разных типов увеличивается, в том числе много аутофагосом, внутри которых заключены целые митохондрии, части эндоплазматического ретикулума и т. д. Через 48 и 72 ч в эктоплазматической зоне отдельных клеток можно наблюдать целые скопления структур, которые по морфологическим признакам можно отнести к

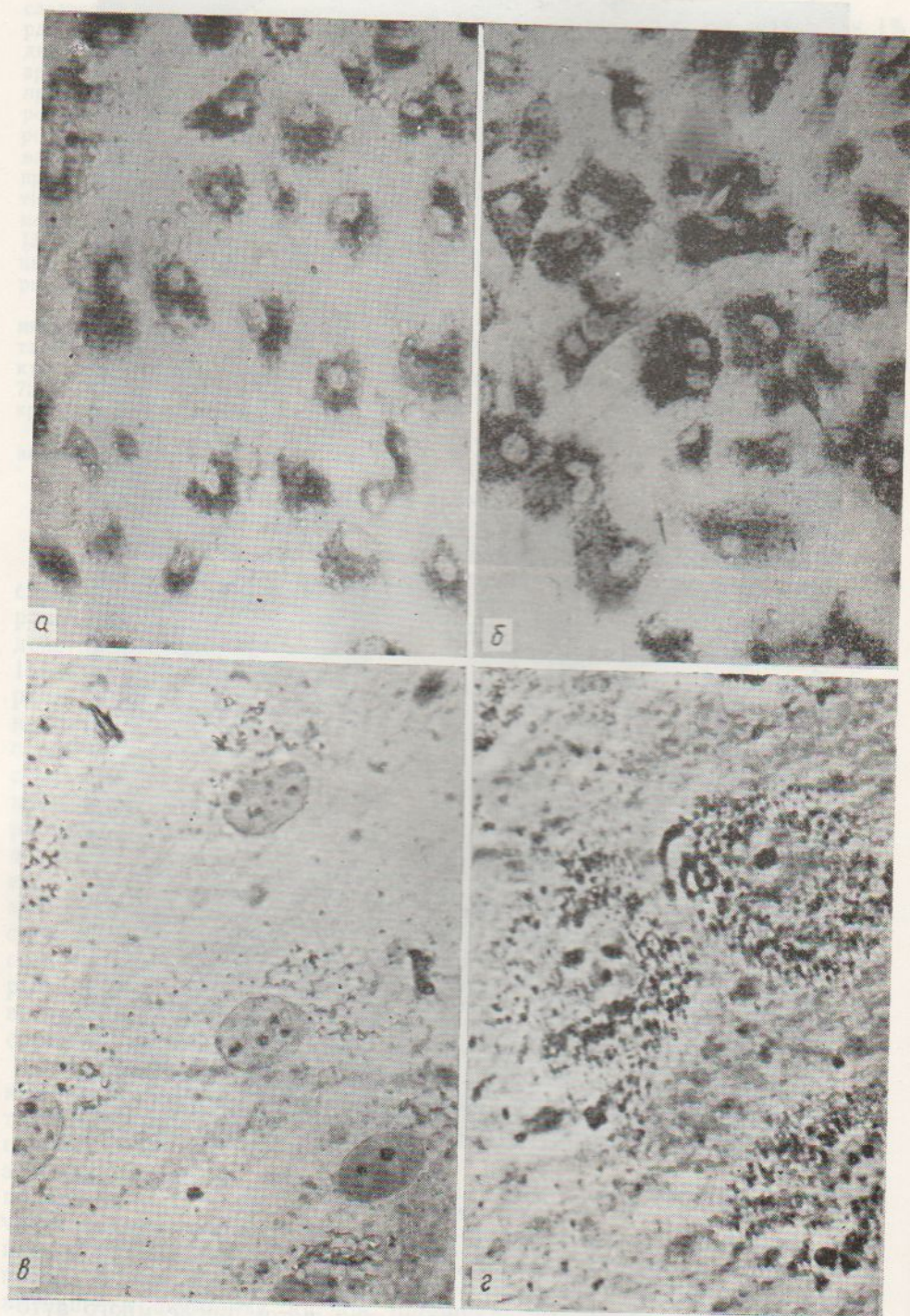


Рис. 2. Повышение активности ферментов кислой фосфатазы (а — контроль, б — опыт; об. 10×Ок. 7,5) и кислой рибонуклеазы (в — контроль, г — опыт; об. 16×Ок. 7,5) в клетках культур тканей семенника через 3 ч после начала воздействия антител.

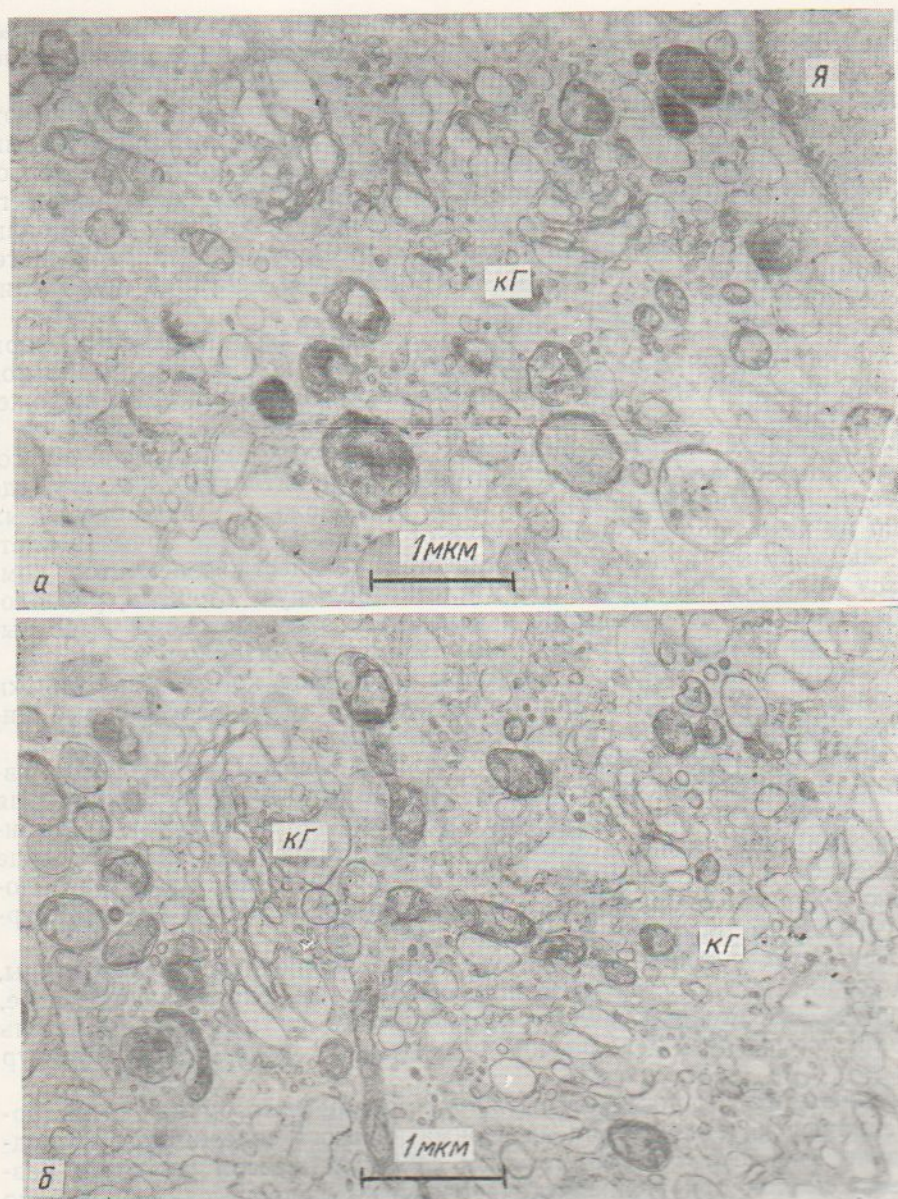


Рис. 3. Увеличение размеров и количества структурных элементов комплекса Гольджи после воздействия антител.

а — контроль, б — опыт; кГ — комплекс Гольджи, я — ядро.

типу постлизосом или остаточных телец (рис. 1, б). Согласно современным представлениям, остаточные тельца являются последним этапом в цепи внутриклеточного переваривания экзогенных и эндогенных веществ, происходят от фаголизосом и аутофаголизосом и содержат остатки веществ, подлежащих удалению из клетки [5].

В процессе развития реакции антиген-антитело заметные изменения наблюдаются также в структуре функционально связанного с лизосомами комплекса Гольджи. Эти изменения выражаются преиму-

щественно в увеличении размеров и количества отдельных составных элементов этой органеллы. Как известно, комплекс Гольджи образован тремя видами структурных компонентов: системой собранных в пачки уплощенных цистерн, микропузырьками, которые располагаются обычно на концах уплощенных цистерн, и крупными вакуолями. Через час после начала воздействия антител наблюдается умеренное расширение цистерн комплекса Гольджи с образованием большего чем в норме количества микропузырьков вокруг них. Через 3 ч в большинстве клеток наблюдается увеличение размеров вакуолярной системы комплекса Гольджи (рис. 3, а, б). Развитие вакуолей происходит за счет расширения цистерн.

В различных клетках удается проследить ряд переходных форм от плоских параллельных цистерн до крупных полостей неправильной формы. Через 24, 48 и 72 ч расширение вакуолярной системы выражено в меньшей степени, чем в предыдущие сроки наблюдения, но в целом комплекс Гольджи в клетках подопытных культур развит гораздо сильнее, чем в клетках контрольных и интактных культур, где элементы комплекса Гольджи на срезе расположены в виде отдельных групп на некотором расстоянии друг от друга. В то же время в клетках подопытных культур увеличивается количество элементов комплекса Гольджи, они занимают в клетке большую площадь, расположены более плотно, компактно и вследствие этого органоид четко выделяется на фоне других структурных элементов цитоплазмы.

Через 24, 48 и 72 ч наблюдения в составе комплекса Гольджи преобладают пузырьки и хорошо развитые, слегка расширенные цистерны с электроннопрозрачным содержанием.

Характерным для комплекса Гольджи ферментом-маркером является тиаминпирофосфатаза. При гистозиматической реакции для световой микроскопии структуры, обладающие активностью тиаминпирофосфатазы, видны в клетках культур тканей семенника в виде окрашенной в коричневый цвет сеточки, которая по своему расположению в перинуклеарной зоне и конфигурации соответствует структурным элементам комплекса Гольджи.

В клетках подопытных культур можно наблюдать, что структуры, обладающие активностью тиаминпирофосфатазы, окрашиваются ярче, петли сеточки утолщаются, а расположенные на пересечении петель вакуоли крупнее в сравнении с клетками контрольных культур (рис. 4 а, б).

В первые годы после открытия Де Дювом лизосом как структурной единицы и установления их энзиматического содержимого господствовало мнение о том, что главная функция лизосом состоит в разрушении клеток при различных патологических процессах. Однако по мере накопления фактов была выяснена важная роль лизосом в различных физиологических процессах в организме. Наряду с участием во многих процессах жизнедеятельности (внутриклеточное пищеварение, аутолиз, секреторная деятельность) лизосомы играют важную роль в защитных реакциях клетки. Исследования, проведенные на современном методическом уровне с применением электронной микроскопии и метки введенных веществ изотопами или красителями, показали, что проникшие в клетку чужеродные вещества в дальнейшем обнаруживаются в лизосомах [8, 9, 10]. Разрушение в лизосомах захваченных веществ имеет значение для защитных реакций не только клетки, но и организма в целом.

Как было сказано выше, разрушение антигенов в лизосомах является одним из условий дальнейшего образования антител. Деятельность

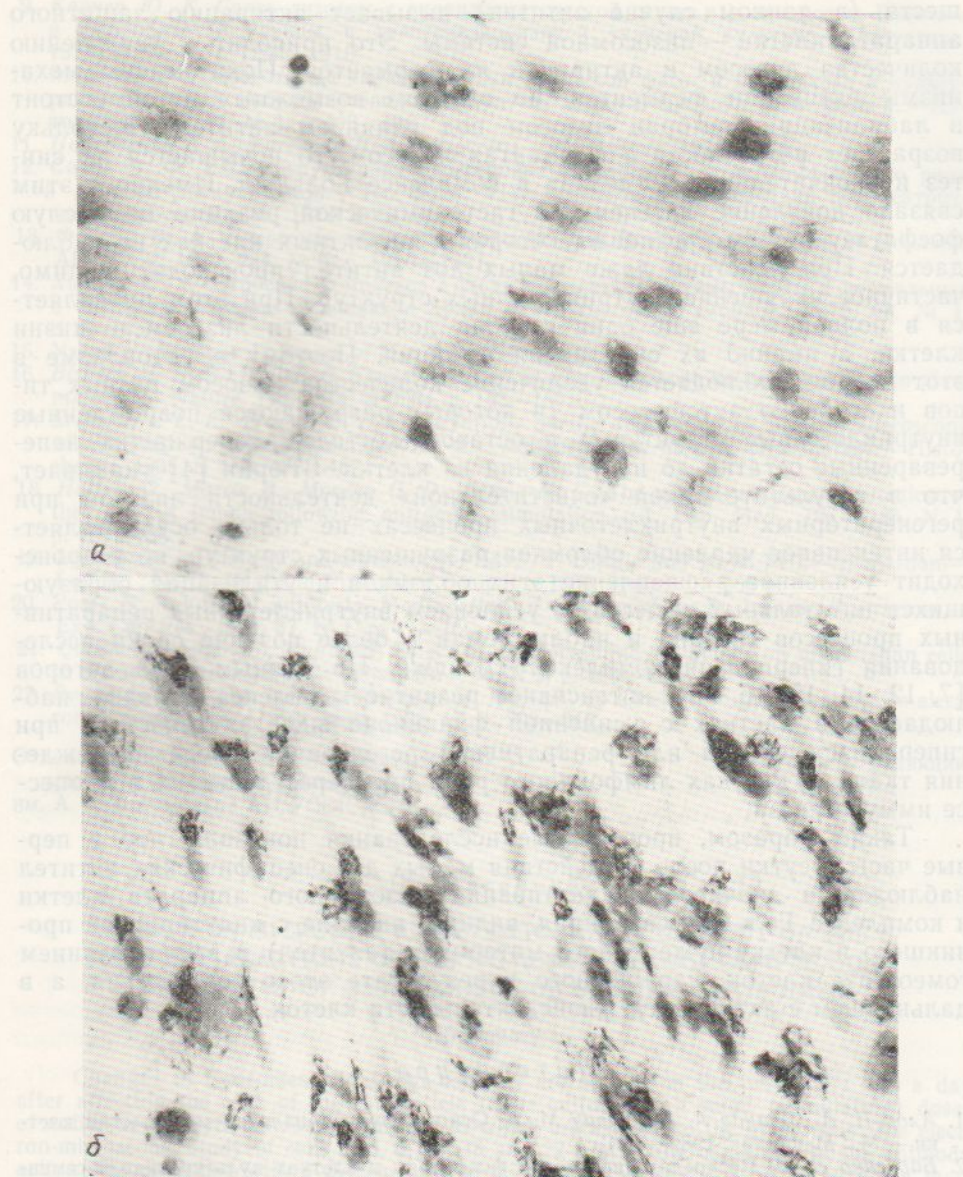


Рис. 4. Повышение активности фермента тиаминпирофосфатазы в клетках культур тканей семенника через 3 ч после начала воздействия антител.  
а — контроль, б — опыт. Об. 10×Ок. 7,5.

лизосом как защитного аппарата клетки активируется при различных воздействиях, в том числе и при иммунных реакциях [2, 19, 20, 21].

Лизосомная система функционально связана с комплексом Гольджи, через который проходят ферменты лизосом, синтезированные на рибосомах эндоплазматического ретикулума, и который принимает участие в формировании первичных лизосом, содержащих эти ферменты [1].

В свете этих данных полученные нами результаты можно трактовать следующим образом: проникновение в клетку чужеродных ве-

ществ (в данном случае антител) вызывает активацию защитного аппарата клетки — лизосомной системы. Это приводит к увеличению количества лизосом и активации их ферментов. Пока неясны механизмы активации ферментов, но один из возможных путей состоит в лабильности мембран лизосом под влиянием антител. Поскольку возрастает потребность в ферментах лизосом, то повышается их синтез и окончательная «отделка» в комплексе Гольджи. Именно с этим связано появление интенсивной гистохимической реакции на кислую фосфатазу в этом органоиде, которая в интактных клетках не наблюдается. При действии даже малых доз антител происходит, видимо, частичное нарушение внутриклеточных структур. При этом проявляется в полной мере еще одна сторона деятельности лизосом в жизни клетки, а именно их санитарная функция. Поэтому в цитоплазме в этот период наблюдается увеличение количества лизосом разных типов и особенно аутофагосом (в которых разрушаются поврежденные внутриклеточные структуры) и остаточных телец, содержащих непереваренные остатки до их удаления из клетки. Втюрин [4] указывает, что в результате такой «очистительной» деятельности лизосом при регенераторных внутриклеточных процессах не только осуществляется интенсивное удаление обломков разрушенных структур, но и происходит усиленное расщепление этих обломков и утилизация образующихся питательных веществ. С усилением внутриклеточных репаративных процессов связана и наблюдаемая в более поздние сроки исследования гиперплазия комплекса Гольджи. По данным ряда авторов [7, 12, 14, 15, 16, 18], интенсивное развитие комплекса Гольджи наблюдается в клетках с усиленной функциональной активностью: при гиперплазии органа или репаративной регенерации после повреждения ткани, в клетках лимфоидного ряда при перестройке их в процессе иммуногенеза.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в первые часы и сутки после воздействия малых доз специфических антител наблюдается значительная активация лизосомного аппарата клетки и комплекса Гольджи связанная, видимо, вначале с инактивацией проникшего в клетку чужеродного материала (антител) и выравниванием гомеостаза клеток, нарушенного в результате этого воздействия, а в дальнейшем с активацией жизнедеятельности клеток.

### Литература

1. Алов И. А., Брауде А. И., Аспиз М. Е. Основы функциональной морфологии клетки. — М.: Медицина, 1969. — 341 с.
2. Барченко Л. И. Распределение кислой фосфатазы в клетках культур тканей семенника и яичника после воздействия различных доз антителикулярной и антиварикальной цитотоксических сывороток. — Цитотоксины в соврем. медиц., вып. 6, Киев: Здоров'я, 1972, с. 66—71.
3. Берстон М. Гистохимия ферментов. — М.: Мир, 1965. — 438 с.
4. Втюрин Б. В. Значение лизосом в деструктивных и регенераторных внутриклеточных процессах. — Тез. докл. VIII Всесоюзной конференции по электронной микроскопии. М., 1971, 3, с. 52.
5. Втюрин Б. В., Орлов Г. Н. Некоторые вопросы функциональной морфологии лизосом. — Архив патологии, 1971, 33, № 4, с. 8—17.
6. Глузман Д. Ф. Энзимогистохимическое исследование клеток крови и кроветворных органов при лейкозах человека и млекопитающих: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. — Киев, 1974. — 34 с.
7. Дмитриева Н. П. Электронномикроскопическое изучение комплекса Гольджи в гиперплазированной и малигнизированной эпителиальной клетке. — Цитология, 1972, 14, № 1, с. 13—18.
8. Кирьянова Е. А., Зеленин А. В. Некоторые закономерности накопления инородных для клетки веществ в лизосомах. — Доклады АН СССР, 1970, 190, № 2, с. 451—455.

9. Кярнер Ю. К. Связь лизосом с эндоплазматической сетью и с аппаратом Гольджи в фибробластах курицы в трапсинизированной тканевой культуре.— Цитология, 1971, 13, № 10, с. 1204—1210.
10. Мойжесс Т. Г. Некоторые характеристики процессов фаго- и пиноцитоза в культурах нормальных фибробластоподобных клеток мыши и фибробластов линии L.— Цитология, 1969, 11, № 4, с. 493—498.
11. Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы.— М.: Наука, 1976.—368 с.
12. Салов В. Ф. Ультраструктурная перестройка некоторых клеток лимфоидного ряда в процессе иммуногенеза.— Тез. докл. VIII Всесоюзной конференции по электронной микроскопии, М., 1971, 3, с. 81.
13. Фролов В. А. Лизосомы миокарда морской свинки при анафилаксии.— Доклады АН СССР, 1977, 234, № 5, с. 1220—1221.
14. Хилова Ю. К. Строение комплекса Гольджи в клетках интимы аорты в нормальных и экспериментальных условиях.— Архив анат., гистол. и эмбриол., 1975, 68, № 1, с. 43—45.
15. Уэйли У. Аппарат Гольджи.— М.: Мир, 1978.—245 с.
16. Birbeck M. S. C., Hall J. G. Transformation in vivo of basophilic lymph cells into plasma cells.— Nature, 1967, 214, N 5084, p. 183—185.
17. Ericsson I. L. E., Trumpf B. F. Observations on the application of electron microscopy of the lead phosphate technique for the demonstration of acid phosphatase.— Histochemie, 1965, N 4, p. 470—487.
18. Hall J. G., Morris B., Moreno G. D., Bessis M. C. The ultrastructure and function of the cells in lymph following antigenic stimulation.— J. Exp. Med., 1967, 125, N 1, p. 101—106.
19. Lysosomes in Biology and Pathology. / Ed. J. T. Dingle and H. B. Fell.—Amsterdam—London: North-Holland Publishing company, 1969, 2, part 1.—668 p.
20. Poste G. Sub-lethal autolysis. Modification of cell periphery by lysosomal enzymes.— Exp. Cell Res., 1971, 67, N 1, p. 11—16.
21. Quash G., Delain E., Hupper J. Effect of antipolyamine antibodies on mammalian cells in tissue culture.— Exp. Cell Res., 1971, 66, N 2, p. 426—429.
22. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.— J. Cell Biol., 1963, 17, p. 208—212.

Отдел иммунологии и цитотоксических  
сывороток Института физиологии  
им. А. А. Богомольца АН УССР, Киев

Поступила в редакцию  
15.VI 1979 г.

L. I. Barchenko

# ELECTRON-MICROSCOPIC AND CYTOCHEMICAL STUDY OF THE PRIMARY REACTIONS OF LYSOSOMES AND GOLGI COMPLEX ON THE EFFECT OF SMALL DOSES OF SPECIFIC ANTIBODIES

## Summary

Changes in lysosomes and Golgi complex are studied in the first hours and a day after affecting the cells of the rat testicle tissue cultures with small (stimulating) doses of antitesticular cytotoxic serum antibodies which are specific to the given cells. The electron-microscopic study of cells 1, 3, 6, 24, 48 and 72 h after the beginning of the antibody action was combined with a cytochemical study in the same periods of the enzymes, markers of lysosomes and Golgi complex, such as acid phosphatase, acid ribonuclease and thiamine pyrophosphatase. The experiments conducted showed that in the first hours and a day after the effect of the stimulating doses of the specific antibodies a considerable activation is observed of the lysosome apparatus of the cell and Golgi complex which may be associated at first with inactivation of the foreign material (antibody) penetrated into the cell and the levelling of the cell homeostasis, disturbed due to this effect, and further with activation of the cells vitality.

Department of Immunology and  
Cytotoxic Sera, A. A. Bogomoletz Institute  
of Physiology, Academy of Sciences,  
Ukrainian SSR, Kiev