

Содержание и ультраструктура CD4⁺-лимфоцитов крови здоровых людей и больных сахарным диабетом I типа

Получение моноклональных антител (МАТ) открыло принципиально новые возможности изучения лимфоидных клеток различного иммунологического фенотипа при физиологических и патологических процессах. В результате изобретения метода лазерной проточной цитофлуориметрии был автоматизирован анализ отдельных типов клеток, маркированных МАТ, что обусловило высокую точность определения их числа в образцах, а также возможность получения высокоочищенных фракций иммунологически однородных клеток для цитологических исследований [5, 8, 16]. Данные по изучению ультраструктуры различных субпопуляций лимфоцитов крови человека при использовании проточной цитофлуориметрии малочисленны. Особенно это касается субмикроскопической организации CD4⁺-клеток, выполняющих в организме хелперную и индукторную функции при образовании иммуноглобулинов В-лимфоцитами, а также супрессорную — в ряде иммунологических реакций. Мы располагаем лишь работами об ультраструктуре CD4⁺-лимфоцитов крови здорового человека [8, 13, 16]. Какой-либо информации об субмикроскопическом строении CD4⁺-клеток при гипопитуитаризме, т. е. инсулинзависимом сахарном диабете (ИЗСД) I типа, нет.

Цель нашей работы — изучение содержания и особенностей ультраструктуры CD4⁺-лимфоцитов, выделенных с помощью метода проточной цитофлуориметрии из крови здоровых людей и больных ИЗСД, для выяснения роли этих клеток в механизме нарушенного иммунного статуса при данном заболевании.

Методика

Исследовали венозную гепаринизированную кровь первичных доноров и первичных нелеченых больных ИЗСД. Выявление CD4⁺-клеток проводили с помощью МАТ к антигену CD4 (фирма «Coulter Immun.», США). Для этого из крови дифференциальным центрифугированием в градиенте плотности «Фиколл-Пак» (фирма «Pharmacia», Швеция) выделяли мононуклеары. Прилипающие клетки удаляли инкубацией в среде RPMI-1640 (фирма «Serpa» ФРГ) с добавлением 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки в пластмассовых чашках Петри (фирма Falcon) в течение 1 ч в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °C. Затем клетки отмывали в среде RPMI-1640 повторным центрифугированием, инкубировали с МАТ к CD4-антигену с последующей обработкой клеток, мечеными FITC (фирма «Coulter Immun.», США) козьими антителами против иммуноглобулинов мыши. Определение CD4⁺-клеток крови и их выделение проводили на проточном цитофлуориметре Epics-C (фирма «Coulter Electronics», США). Качество сортировки (96 % положительных клеток) было подтверждено повторным анализом флуоресценции ранее отсортированных клеток. Выделенные CD4⁺-клетки фиксировали 1,6 %-ным раствором глutarового альдегида в 0,1 моль/л сбалансированном фосфатном буфере (300 мосм), постфиксировали 1 %-ным раствором тетраоксида осмия и заключали в аралдит. Срезы изготавливали на ультратоме LKB-8800 (Швеция), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и исследовали под электронным микроскопом JEM-100С (фирма «Jeol», Япония). При определении содержания CD4⁺-лимфоцитов в каждом образце анализировали по 25 000 клеток и получали соответствующие гистограммы. В качестве контроля использовали иммуноглобулины того же, что и МАТ, изотипа (IgG1). Сопоставление результатов опыта и данных контроля, а также статистику проводили на ЭВМ.

Результаты

Установлено, что среди лимфоцитов крови обследованных нами здоровых людей CD4⁺-лимфоциты составляют $(36,76 \pm 2,5) \%$, или $(0,834 \pm \pm 0,061) \cdot 10^9$ клеток в 1 л крови. При электронно-микроскопическом исследовании обнаружено, что клетки CD4⁺-фракции являются, преимущественно, малыми лимфоцитами диаметром 4,9—5,5 мкм. Большинство лимфоцитов, экспрессирующих CD4-антиген, характеризуются высоким ядерно-цитоплазматическим (я/ц) отношением и бедной органоидами цитоплазмой. Ультраструктура CD4⁺-клеток крови неоднородна. На основании анализа ряда параметров, а именно: размера клетки, я/ц отношения, характера ядра и цитоплазмы, а также содержания, топографии и структуры гранул, эти клетки условно разделены нами на четыре группы:

1-я — малые лимфоциты с высоким я/ц отношением, содержащие электронно-плотные гранулы, сгруппированные в цитоплазме в виде кластера. Гранулы разнообразны по размеру, но почти всегда однородной структуры, зачастую расположены возле тельца Голла (рис. 1, а). Для этой категории клеток характерны: слабо развитый аппарат Гольджи, единичные элементы шероховатого эндоплазматического ретикулума (ШЭР), несколько митохондрий, обилие свободных рибосом и полисом, неровное ядро, часто с глубокими инвагинациями, конденсированным хроматином вдоль ядерной мембраны и отдельными глыбками в центре ядра. Такие клетки составляют 40—50 % всех CD4⁺-лимфоцитов;

2-я — малые лимфоциты с высоким я/ц отношением, содержащие одну — две гранулы, слабо развитый аппарат Гольджи, несколько митохондрий, единичные элементы ШЭР, обилие свободных рибосом и полисом. Ядро округлое или овальное. Конденсированный хроматин расположен вдоль ядерной мембраны и отдельными глыбками в центре ядра (рис. 1, б). Около 20 % CD4⁺-лимфоцитов представлено такими клетками;

3-я — малые лимфоциты с высоким я/ц отношением, не содержащие гранул. Контур плазматической мембраны сглажен. Цитоплазма бедна органоидами. Для этой группы клеток характерно округлое эухроматинное ядро с хорошо контурирующим ядрышком (рис. 1, в). Содержание этих клеток не превышает 20 %;

4-я — большие или средние лимфоциты с низким я/ц отношением и значительным числом микровыростов на клеточной мембране. Электронно-плотные гранулы диспергированы по всей цитоплазме (рис. 1, г). Наряду с типичными гранулами обнаруживаются электронно-плотные образования, похожие на барабанные палочки, запятые, полулунные (рис. 1, д). В отдельных клетках некоторые гранулы содержат параллельно-трубчатые структуры (ПТС; рис. 1, е). Для лимфоцитов этой группы характерны: более развитый аппарат Гольджи, большее число митохондрий и элементов ШЭР. В их цитоплазме постоянно обнаруживается скопление β-зерен гликогена. Ядро с неровными контурами, вогнутое, со значительными инвагинациями. Конденсированный хроматин расположен вдоль ядерной мембраны или отдельными глыбками в середине ядра. Морфологически они сходны с большими грануло-содержащими лимфоцитами (БГЛ), хотя содержат гранулы несколько меньшего размера. Таких клеток около 15—20 %.

В крови больных ИЗСД содержание CD4⁺-лимфоцитов по отношению ко всей популяции лимфоцитов составляет $(32,15 \pm 2,31) \%$, или $(0,531 \pm 0,094) \cdot 10^9$ клеток в 1 л крови, что на 36 % ниже, чем у доноров ($P < 0,02$). У отдельных больных абсолютное содержание CD4⁺-клеток в 1 л крови снижено до $(0,247—0,262) \cdot 10^9$ клеток в 1 л крови. При электронно-микроскопическом исследовании выделенной фракции CD4⁺-лимфоцитов оказалось, что это снижение обусловлено уменьшением числа клеток преимущественно 1-й и 2-й групп. Одновременно несколько увеличивалось число клеток 3-й и 4-й групп.

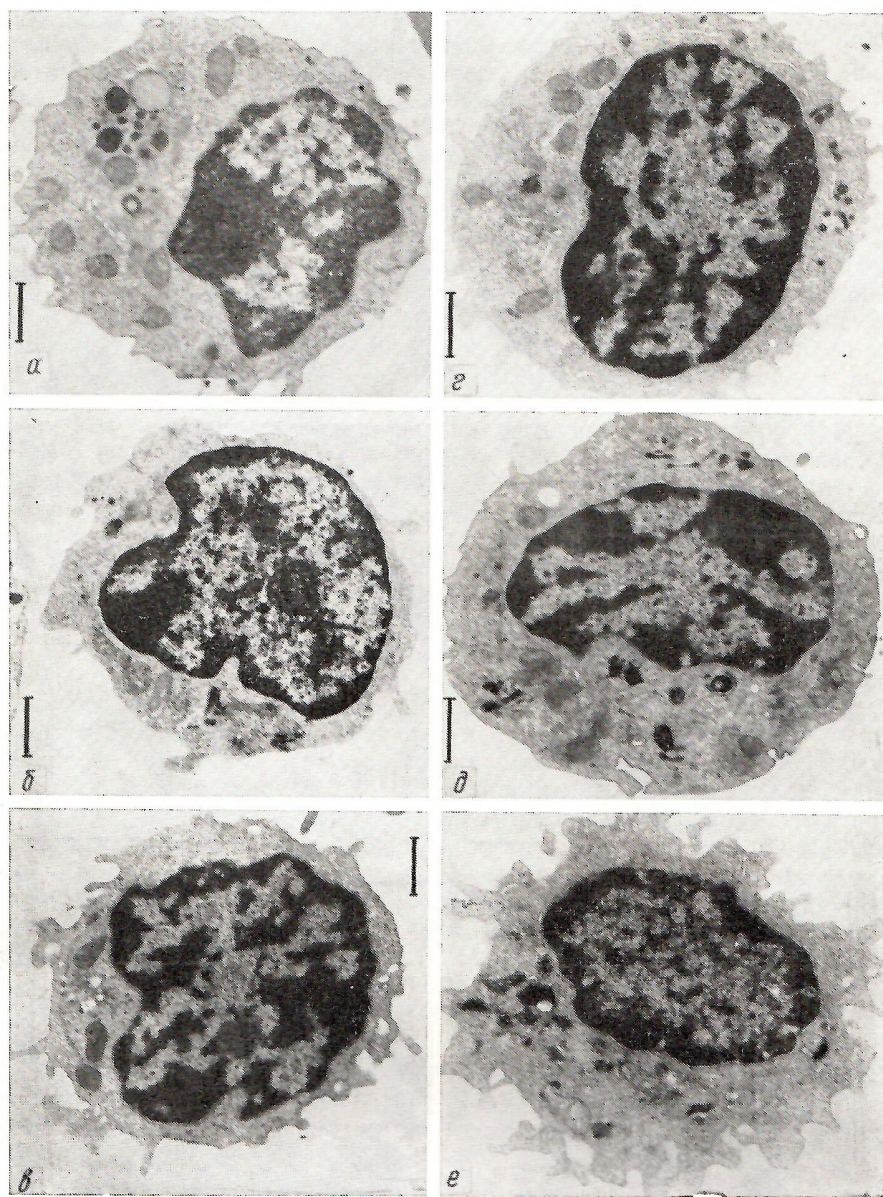


Рис. 1. Ультраструктура CD4⁺-лимфоцитов крови здоровых кудей: а — лимфоцит 1-й группы с гранулами, сгруппированными в виде кластера, $\times 9500$; б — лимфоцит 2-й группы, содержащий единичные гранулы в цитоплазме, $\times 9000$; в — лимфоцит 3-й группы, не содержащий гранул, $\times 9000$; г, д — лимфоциты 4-й группы с гранулами, диспергированными в цитоплазме, $\times 10\,000$; е — лимфоцит 4-й группы, содержащий параллельно-трубчатые структуры, $\times 10\,000$.

Наиболее выраженные изменения ультраструктуры наблюдались в лимфоцитах 1-й группы. Они заключались в дисагрегации гранул кластера и нарушении их строения. Часто в гранулах, составляющих кластер, обнаруживались ПТС, чего не наблюдалось у здоровых людей (рис. 2, а). Многие гранулы были вакуолизированы, содержали остатки электронно-плотного вещества или ПТС (рис. 2, б).

В лимфоцитах 4-й группы отмечалось увеличение числа и размера гранул, многие из которых были вакуолизированы, содержали матрикс разнородной плотности, частично или полностью были заполнены ПТС (рис. 2, в). Нередко ПТС выявлялись за пределами гранул или располагались в цитоплазме самостоятельно (рис. 2, г). Такие клетки имели

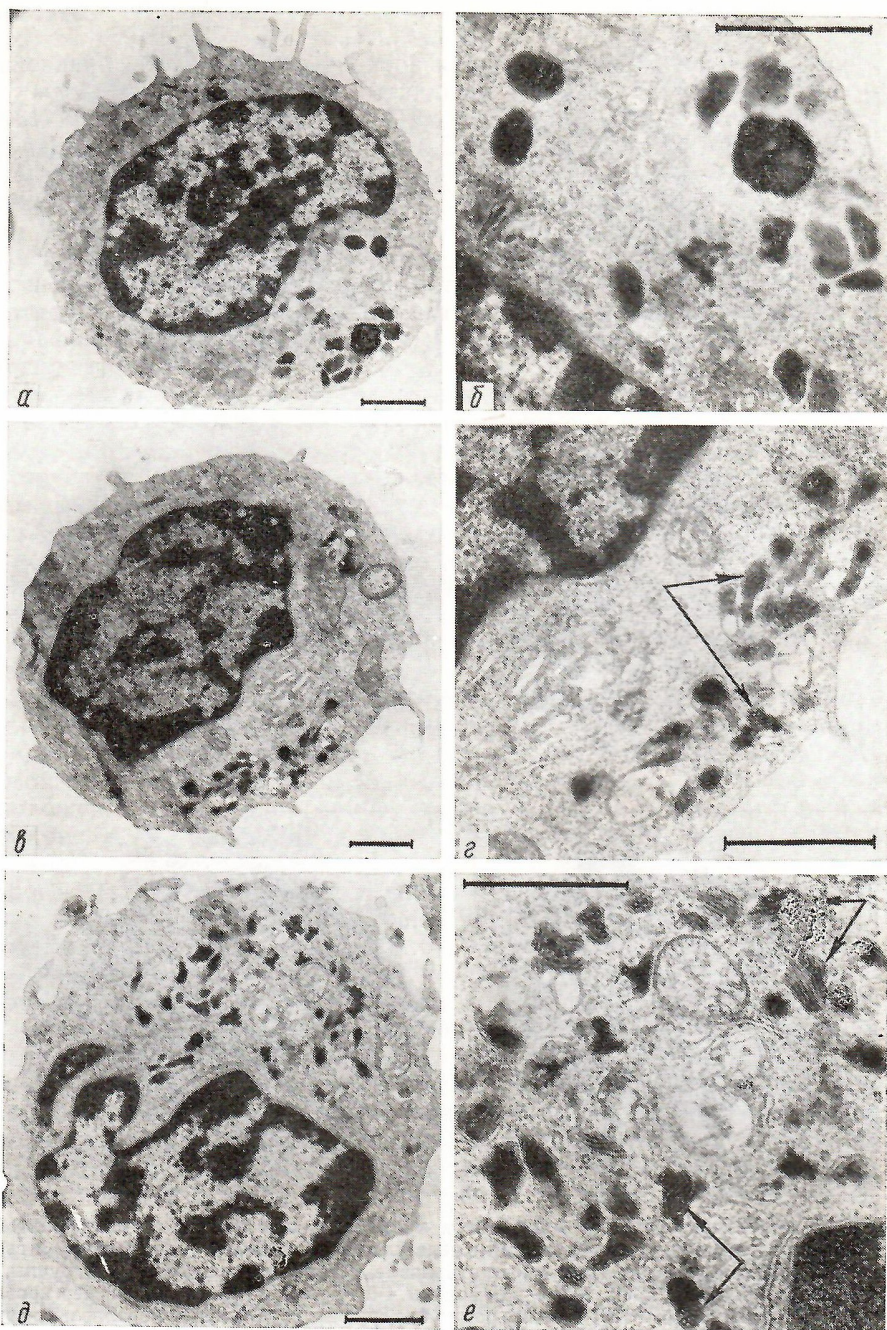


Рис. 2. Ультраструктура $CD4^+$ -лимфоцитов крови больных сахарным диабетом I типа. а — лимфоцит 1-й группы, $\times 10\,000$; б — его фрагмент, $\times 25\,000$ (дисагрегация гранул и наличие в них параллельно-трубчатых структур — ПТС); в — лимфоцит 4-й группы, $\times 10\,000$; г — его фрагмент, $\times 25\,000$ (увеличение числа и размера гранул, их вакуолизация, наличие ПТС в гранулах — указано стрелкой); д — лимфоцит с большим количеством ПТС, $\times 12\,000$; е — его фрагмент, $\times 27\,000$ (ПТС обозначены стрелкой).

более развитый комплекс Гольджи и увеличенное число митохондрий. Наблюдалось многообразие переходных форм клеток 1-й, 2-й и 4-й групп.

В крови больных ИЗСД выявлен особый тип $CD4^+$ -клеток, число которых варьировало в пределах 3—5 %. Это самые крупные лимфоциты с низким я/ц отношением. Их широкая цитоплазма в излучине ядра

и возле аппарата Гольджи заполнена ПТС (рис. 2, *д*, *е*). Для них характерны неровный контур клеточной мембраны с короткими микроворсинками, эксцентричное расположение ядра со множеством инвагинаций разной глубины, небольшое число митохондрий и других оргanelл. Подобные лимфоциты мы наблюдали также в субпопуляциях $T8^{+}$ - и $NKH1^{+}$ -клеток крови больных сахарным диабетом.

Обсуждение

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что основная часть $CD4^{+}$ -клеток крови здоровых людей представлена малыми лимфоцитами с высоким я/ц отношением, что согласуется с данными предыдущих исследований, в которых $CD4^{+}$ -клетки маркировали комплексом соответствующих МАТ с пероксидазой [2, 13], коллоидным золотом [13], розеткообразованием по наличию T_{H} -рецептора [11] или исследовали концентраты $CD4^{+}$ -клеток [8, 16]. Вполне возможно, что значительная часть лимфоцитов, выделенных нами во 2-ю группу, фактически относятся к 1-й, так как весь кластер гранул мог не попасть в срез.

Морфологические особенности $CD4^{+}$ -лимфоцитов 3-й группы, в частности наличие эухроматинного ядра, дают основание считать, что это более молодые или стимулированные клетки.

Особый интерес вызывают $CD4^{+}$ -лимфоциты 4-й группы. По ультраструктуре они похожи на БГЛ, являющиеся естественными клетками-киллерами (ЕКК), но гранулы первых меньшего размера [1, 2, 16]. Показано, что подобные клетки образуют конъюгаты с клетками культуры К562, но в отличие от типичных БГЛ они не способны лизировать клетки-мишени [16]. По мнению Velardi и соавт. [16] и Blue и соавт. [6], большие $CD4^{+}$ -клетки с мелкими цитоплазматическими гранулами являются предшественниками БГЛ, которые при дальнейшей дифференцировке теряют $CD4$ -антиген. Известно также, что 3—4 % Т-лимфоцитов крови здорового человека одновременно экспрессируют $CD4$ -и $CD8$ -антигены [7, 14]. Полагают также, что в крови человека есть небольшая группа $CD4^{+}$ -лимфоцитов, одновременно экспрессирующая $CD3$ -, $CD4$ -, $CD11$ -антигены [15]. Большинство клеток этого фенотипа не обладает естественной цитотоксичностью, хотя по ультраструктуре похожи на БГЛ.

Полученные нами результаты согласуются с современным представлением о многофункциональности $CD4^{+}$ -лимфоцитов. $CD4^{+}$ -клетки, рестриктивные в своем действии главным комплексом гистосовместимости II класса (HLA-DR), обладают способностью хелперов, индуцируя синтез иммуноглобулинов В-клетками (субкласс $2H4^{-}$, $4B4^{+}$, $Leu8^{-}$), и индукторов супрессоров (субкласс $2H4^{+}$, $4B4^{+}$, $Leu8^{+}$), а также другими функциями [7, 12].

При гипoinsулинизме выявлены четкие изменения $CD4^{+}$ -лимфоцитов. Так, относительное и абсолютное содержание $CD4^{+}$ -клеток в крови большинства больных ИЗСД было снижено, что согласуется с данными литературы [9]. Проведенными исследованиями выявлено, что такое снижение обусловлено уменьшением в крови числа лимфоцитов 1-й и 2-й групп, которые, как предполагают, относятся к Т-хелперам. Изменением их числа и ультраструктуры органоидов можно объяснить механизм тех значительных нарушений антителообразования, которые обнаруживаются у больных сахарным диабетом [9].

Относительное число лимфоцитов 3-й группы у больных ИЗСД возрастает (у здоровых — около 20 %, у больных — до 30 %). Увеличение числа стимулированных Т-лимфоцитов (HLA-DR⁺-клеток) в крови больных ИЗСД описано и другими авторами [9]. Возрастание относительного числа и изменение субмикроскопической организации клеток 4-й группы, которые, как считают Velardi и соавт. [16] и Blue и соавт. [7], являются супрессорами или предшественниками БГЛ, подтверж-

дают существующее мнение о неполноценности системы ЕКК при ИЗСД [4].

Таким образом, анализ собственных исследований и данных литературы показывает, что субпопуляция Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD4⁺-антиген, морфологически и функционально неоднородна. При гипопитуитаризме отмечается изменение не только соотношения отдельных групп CD4⁺-лимфоцитов, но и их ультраструктуры, что указывает на существенное значение этих клеток в механизмах нарушенного гуморального и клеточного иммунитета при ИЗСД у человека.

THE CONTENT AND ULTRASTRUCTURE OF CD4⁺ BLOOD LYMPHOCYTES IN HEALTHY PEOPLE AND PATIENTS WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS

B. M. Khomenko, M. A. Gruzov, V. S. Shlyakhovenko, D. I. Lukinov,
S. V. Komissarenko, K. P. Zak

The flowing cytofluorometric and electron microscopic methods have been used to study the content and ultrastructure of blood CD4 lymphocytes in healthy and type I diabetic patients. Analysis of submicroscopic structure of the lymphocytes expressing CD4 antigen has revealed its morphological heterogeneity. It has permitted distinguishing four groups of cells. A decrease of the content of CD4⁺ lymphocytes at the expense of the first group cells and relative increase in the number of the fourth-group cells are observed in the majority of diabetic patients. The availability of parallel-tubulose structures in granules forming clusters and first-group lymphocytes, an increase in the number and size of granules of the fourth-group are the most typical changes of ultrastructural characteristics.

Institute of Endocrinology and Metabolism,
Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Kiev

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зак К. П., Грузов М. А., Хоменко Б. М., Шляховенко В. С. Ультраструктура больших гранулосодержащих лимфоцитов крови человека // Докл. АН УССР. Сер. Б.—1983.— № 4.— С. 73—77.
2. Зак К. П., Грузов М. А., Хоменко Б. М. и др. Ультраструктура Т-лимфоцитов крови человека, маркированных моноклональными антителами // Бюл. эксперим. биологии и медицины.—1985.— 10.— С. 494—496.
3. Зак К. П., Грузов М. А., Хоменко Б. М. и др. Ультраструктура больших гранулосодержащих лимфоцитов, обладающих естественной киллерной активностью // Арх. анатомии.—1986.— 90, № 6.— С. 37—42.
4. Зак К. П., Хоменко Б. М., Афанасьева В. В., Сакало Е. А. Содержание и ультраструктура больших гранулосодержащих лимфоцитов (естественных клеток-киллеров) в крови больных сахарным диабетом I типа // Пробл. эндокринологии.—1987.— 33, № 4.— С. 3—5.
5. Комиссаренко С. В., Лукинов Д. И., Грузов М. А. и др. Ультраструктура Т8⁺ больших гранулосодержащих лимфоцитов крови, выделенных методом проточной цитофлуориметрии // Докл. АН СССР.—1986.— 289, № 4.— С. 1022—1024.
6. Blue M.-L., Daley J. F., Levine H. et al. Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cell demonstrated by two-colour fluorescence flow cytometry // J. Immunol.—1985.— 134, N 4.— P. 2281—2286.
7. Blue M.-L., Daley J. F., Levine H. et al. Activation of immature cortical thymocytes through the T11 sheep erythrocyte binding protein // Ibid.—1987.— 138, N 10.— P. 3108—3113.
8. Boesen A. M., Hokland P. Ultrastructure of Normal Human Blood T-Lymphocyte Subsets Isolated by Cell Sorting Using Monoclonal Antibodies // Virchows Arch. Cell Pathol.—1982.— N 41.— P. 107—117.
9. Drell D. W., Notkins A. L. Multiple immunological abnormalities in patients with Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus // Diabetologia.—1987.— 30.— P. 132—143.
10. Feremans W. W., Huygen C., Mean R. et al. Ultrastructural Study of Circulating Lymphocytes in 50 Cases of HIV Infection // Pathol. Res. and Pract.—1987.— 182, N 4.— P. 488.
11. Kanajama J., Hiraoka A., Konishi I. et al. Ultrastructure of normal human T cell subpopulations. Parallel tubular arrays in T-lymphocytes and clustered dense bodies in T-lymphocytes // Acta haematol.—1983.— 70, N 4.— P. 220—228.
12. Kanof M., Strober W., James S. Induction of CD4 suppressor T-cells with anti-Leu-8-antibody // J. Immunol.—1987.— 139, N 1.— P. 49—54.