

Ю. А. УМАНСКИЙ, Д. Ф. ГЛУЗМАН, В. М. ЮДИН,
С. П. СИДОРЕНКО, М. И. ФЕДОРОВСКАЯ

ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ МЫШЕЙ

(Представлено академиком П. Г. Костюком 16 I 1975)

В настоящее время выделяют два основных класса лимфоцитов — Т (тимус-зависимые) и В (тимус-независимые). Т-лимфоциты участвуют, главным образом, в реакциях клеточного иммунитета и осуществляют иммунный надзор за генетическим постоянством организма, а В-клетки ответственны за выработку антител (^{1, 2}).

До сих пор Т- и В-клетки, обладающие разными поверхностными антигенами, набором и структурой мембранных рецепторов идентифицировали почти исключительно иммунологическими приемами — с помощью специфических иммунных сывороток, теста розеткообразования и других (^{3, 4, 5}). Морфологические методы их распознавания пока не получили должного распространения. Сканирующая электронная микроскопия позволяет отличить Т- и В-лимфоциты по структуре рельефа поверхностных мембран (⁶), но этот метод слишком сложен и пока малодоступен для большинства исследователей. Результаты трансмиссионной электронной микроскопии оказались противоречивыми и потребовали уточнения с помощью сложных методов электронной иммунохимии (⁷). Попытки идентифицировать Т- и В-лимфоциты с помощью методов световой микроскопии не увенчались успехом (⁸).

В 1952 г. Стокингер и Кельнер предложили простую методику окраски РНК-содержащих структур ядра и цитоплазмы клеток метиленовым синим (⁸). С помощью этой методики и ее модификаций ряду авторов удалось показать неоднородность популяций лимфоцитов крови и различных лимфоидных органов человека и животных (⁹⁻¹²). Но отсутствие параллельного иммунологического анализа не позволило этим исследователям связать выявленные цитологические особенности с определенными категориями лимфоцитов.

Целью данной работы были поиск критериев, которые дали бы возможность идентифицировать Т- и В-лимфоциты при обычной световой микроскопии.

Для исследования готовили суспензии клеток периферических лимфотических узлов (паховых, подмышечных и подчелюстных) мышей-самцов линии СЗН/Sn и АКР/ж 3—5-месячного возраста. Из исходных суспензий получали обогащенные Т- или В-лимфоцитами клеточные популяции. Для этого были применены иммунологические приемы, основанные на разных принципах. В макроварианте цитотоксического теста с помощью специфических анти- θ -сывороток удаляли θ^+ -клетки (Т-лимфоциты) из суспензий. При использовании метода клеточной иммуноадсорбции (¹³), благодаря отсутствию у Т-клеток и наличию у основной массы В-клеток мембранного Fc-рецептора, получали популяции, обогащенные Т- или В-лимфоцитами (соответственно неприкрепившиеся и прикрепившиеся фракции).

Иммунологическую идентификацию клеток, несущих θ -антиген (Т-лимфоцитов) и клеток, у которых этот антигенный маркер не выявляется (θ^- -клеток), производили с помощью микроцитотоксического теста.

Таблица 1

Результаты цитологических исследований обогащенных Т- и В-лимфоцитами и контрольных клеточных популяций из лимфатических узлов мышей СЗН/Sn с AKR/j

Линия мышей	Тип клеток	Популяции, обогащенные		Контрольные популяции *
		Т-клетками	В-клетками	
СЗН/Sn	Макронуклеолярный	80±1,0 ***	15±0,7 **	67±2,8
			14±2,2	66±0,8
	Микронуклеолярный	17±0,8	78±1,0	31±0,8
			84±1,0	30±1,2
AKR/j	Другие клеточные элементы	3±0,4	7±0,5	2±0,3
			2±0,4	4±0,4
	Макронуклеолярный	74±0,9	14±1,2	47±1,4
			21±1,7	48±0,7
	Микронуклеолярный	21±0,5	74±2,2	44±0,9
			78±1,7	45±1,1
	Другие клеточные элементы	5±0,4	12±1,2	9±0,9
			1±0,3	7±0,5

* Клеточные суспензии обрабатывали так же, как при процедурах обогащения, но вместо иммунных сывороток использовали соответствующие нормальные сыворотки.

** Верхние строки в графах — результаты применения макроварианта цитотоксического теста.

*** Нижние строки в графах — результаты применения метода клеточной иммуноадсорбции.

Для этого использовали, как и в макроварианте цитотоксического теста, АКР-анти-θ-СЗН и СЗН-анти-θ-АКР изосыворотки, методы получения и тестирования которых были описаны нами ранее (¹⁴).

Из суспензий лимфоидных клеток готовили препараты на предметных стеклах для микроскопического исследования по методу высушенных капель (¹⁵). Окраску РНК-содержащих структур лимфоцитов производили метиленовым синим с последующим дифференцированием в цитратном буфере Зеренсена рН 4,96 по методу Стокингера и Кельнера (⁸). Специфичность реакции проверяли обработкой препаратов 0,05% раствором РНФазы в 0,08 M трис-HCl буфере рН 7,5.

Иммунологический анализ показал, что уровни содержания θ⁺-клеток (Т-лимфоцитов) у интактных мышей СЗН/Sn и АКР/j существенно отличаются между собой — соответственно 70±1,0% и 50±2,0%. При использовании макроварианта цитотоксического теста достигается значительное обогащение популяций θ⁺-клетками, которые в большинстве своем представлены В-лимфоцитами. Но в этих популяциях, клетки которых не обладали чувствительностью к повторной обработке анти-θ-сыворотками и комплементом, вероятно, в небольшом количестве присутствовали Т-лимфоциты с низкой плотностью θ-антигена на своей поверхности, плазматические клетки и другие клеточные элементы.

При использовании метода клеточной иммуноадсорбции неприкрепившиеся фракции содержали заметно большее количество θ⁺-клеток (85±1,0% и 79±2,0% соответственно), чем исходные суспензии лимфоцитов мышей СЗН/Sn и АКР/j. В то же время клетки прикрепившихся фракций не обладали выраженной чувствительностью к анти-θ-сывороткам. Таким образом, неприкрепившиеся фракции содержали преимущественно Т-лимфоциты, но в них, вероятно, присутствовала небольшая примесь В-клеток, не обладавших Fc-рецептором и единичные плазматические клетки. В прикрепившихся фракциях содержались в основном В-лимфоциты, но среди них могли находиться единичные Т-клетки, неспецифически прикрепившиеся к иммуносорбенту, активированные Т-лимфоциты, имеющие Fc-рецептор, плазматические и нелимфоидные клетки (¹³).



Рис. 1. Макро- и микронуклеоярные лимфоциты в смешанных (контрольных) популяциях (а) и популяциях, обогащенных Т- и В-лимфоцитами (б, в). Окраска по Стоккингеру — Кельнеру. Иммерсия, 900х



Рис. 1. 1-я, 2-я, 5-я, 6-я, 7-я структурированные хромосомы *Cicer sativus* L. (слева — фотография, справа — графическое изображение)

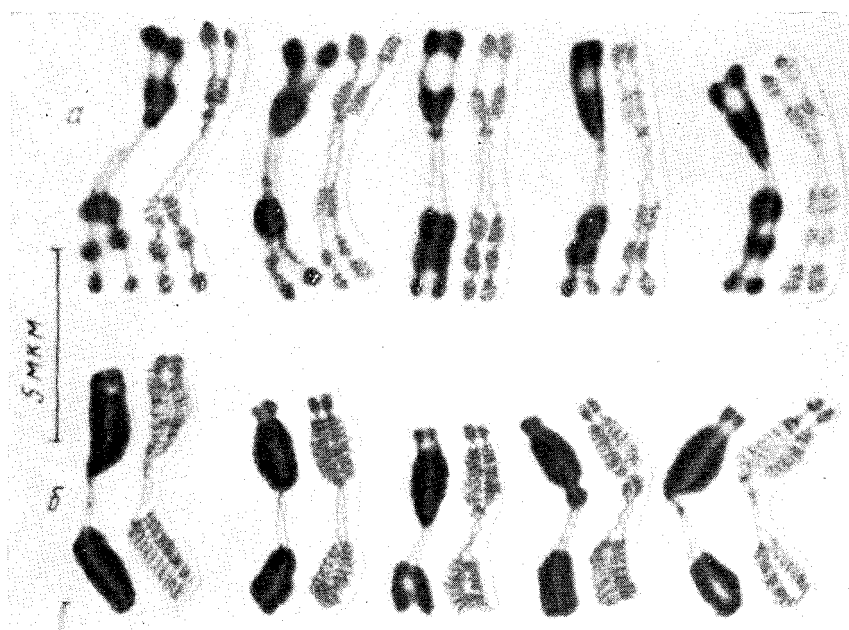


Рис. 2. Морфологическая индивидуальность митотических хромосом *C. sativus* L. Выборка 2-й (а) и 1-й (б) хромосом из разных метафаз одного растения и от разных растений (слева — фотография, справа — графическое изображение)

При исследовании окрашенных препаратов удалось выделить два основных типа клеток. Первый был представлен лимфоцитами с 1—3 крупными четко различимыми ядрышками и выраженной базофильной цитоплазмой. Второй тип клеток составляли лимфоциты с множественными мелкими, подчас плохо различимыми ядрышками и слабо базофильным ободком цитоплазмы (рис. 1). Кроме двух основных типов лимфоцитов в изученных популяциях присутствовали немногочисленные плазматические клетки и некоторые другие клеточные элементы лимфатических узлов. Соотношение клеток первого и второго типа в цитологических препаратах четко коррелировало с соотношением Т- и В-лимфоцитов в исходных и обогащенных тем или иным классом лимфоцитов клеточных фракциях (табл. 1). Полученные данные позволяют считать, что клетки первого типа с морфологическими признаками макроноуклеолярных лимфоцитов являются Т-клетками, а клетки второго типа — микроноуклеолярные лимфоциты — представлены В-клетками.

Таким образом, на основании результатов проведенных исследований представляется возможным использовать эти морфологические признаки для идентификации зрелых Т- и В-лимфоцитов в суспензиях клеток лимфатических узлов интактных мышей. На этой основе могут быть предприняты попытки дифференциации различных типов лимфоцитов и лимфоцитоподобных клеток в крови и кроветворных органах человека и животных в норме и при различных патологических процессах, сопровождающихся нарушением функций лимфоидной ткани.

Институт проблем онкологии
Академии наук УССР
Киев

Поступило
13 I 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ F. M. Burnet, In: Progr. in Exp. Tumor Res., v. 13, 1, Basel/Karger, 1970.
- ² J. F. A. P. Miller, A. Basten et al., Cell. Immunol., v. 2, 5, 469 (1971).
- ³ B. D. Brondz, Transpl. Rev., v. 10, 112 (1972).
- ⁴ H. Wigzell, Ann. Immunol. (Inst. Pasteur), v. 124C, 7 (1973).
- ⁵ M. C. Raff, Nature, v. 242, 5392, 19 (1973).
- ⁶ A. Polliack, N. Lampen et al., J. Exp. Med., v. 138, 3, 607 (1973).
- ⁷ A. Matter, B. Lisowska-Bernstein et al., J. Exp. Med., v. 136, 5, 1008 (1972).
- ⁸ L. Stockinger, G. Kellner, Wien. Zs. inn. Med., B. 33, 4, 135 (1952).
- ⁹ E. Grundman, Klin. Wschz., B. 37, 18, 941 (1959).
- ¹⁰ W. Plennert et al., Fol. Haematol., B. 85, 3, 218 (1966).
- ¹¹ K. Smetana, J. Lejnar, M. Potmesil, Fol. Haematol., B. 91, 4, 381 (1969).
- ¹² И. Т. Муансарян, Пробл. гематол. и перелив. крови, № 5, 28 (1967).
- ¹³ E. Kedar, M. O. de Landazuri, B. Bonavida, J. Immunol., v. 112, 3, 1231 (1974).
- ¹⁴ В. М. Юдин, М. И. Федоровская, Ю. А. Уманский, Бюлл. эксп. биол. и мед., т. 79, № 1 (1975).
- ¹⁵ D. W. van Bekkum, M. J. van Noord et al., Blood, v. 38, 5, 547 (1971).