

Олев ПЫДЕР, Хельги КУУС, Анна ТАММ, Ааде ТЕДЕР

ВЛИЯНИЕ ВЕРОГРАФИНА И ГЛУТАРОВОГО АЛЬДЕГИДА НА ПОВЕРХНОСТНЫЕ СВОЙСТВА ЛИМФОЦИТОВ ОВЕЦ

Лимфоциты являются широко изучаемым объектом биологических исследований, в ходе которых необходимо учитывать воздействие на них различных, в том числе и химических факторов.

Целью данной работы было выяснение некоторых аспектов влияния на свойства внешней мембраны лимфоцитов верографина и глутарового альдегида, используемых соответственно при их выделении из крови и лимфы и при фиксировании клеток.

Верографин — рентгеноконтрастный препарат группы диатризоата, представляющий собой водный раствор смеси солей натрия и метилглюкамина. На основе связи между рентгеноконтрастными веществами (РКВ), альбуминами и глобулинами плазмы предположено (Lang, Lasser, 1971; Сергеев и др., 1980), что эти диагностические агенты взаимодействуют и с другими макромолекулами полипептидной природы, в частности с ферментами. В некоторых работах (Lang, Lasser, 1971, 1975) обнаружено, что РКВ изменяют активность многих ферментов, в том числе и АТФаз.

Поскольку до сих пор еще не созданы РКВ, инертные по отношению к белкам и при прямом контакте не ингибирующие активность большинства ферментов (Сергеев и др., 1980), то необходимо выяснить, в какой мере активность экто-АТФазы лимфоцитов овец подвергается воздействию верографина во время градиентного центрифугирования лимфы.

Лимфоциты выделяли из лимфы грудного протока годовалых баранов двумя методами: рефрижераторным (ЦРЛ-1) и градиентным центрифугированием (Месипуу и др., 1981). В последнем случае разделяющим агентом служил 60%-ный верографин («Спофа», ЧССР), который разбавляли до 14,3% (плотность 1,076). Промытые лимфоциты суспендировали в трехкратном объеме физиологического раствора. Для определения их экто-АТФазной активности 0,03 мл суспензии лимфоцитов инкубировали при 37 °С в течение 30 мин, затем действовали по описанной ранее методике (Куус, Тамм, 1982). Полученный материал обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия.

Результаты девяти сравнительных опытов доказывают, что выделение лимфоцитов из лимфы с раствором верографина подавляет экто-АТФазную активность в среднем на 5,6% ($P < 0,001$). В принципе возможно, что верографин, как и любые другие физиологически активные низкомолекулярные соединения, может воздействовать на активность ферментов, изменяя количество и доступность кофакторов, активаторов, ингибиторов, субстратов, а также непосредственно влиять на структуру фермента или физико-химические свойства его сольватного окружения. Поскольку введение гидрофобных радикалов в молекулу РКВ усиливает их ингибирующее действие (Lang, Lasser, 1971, 1975), можно предположить, что полученное нами подавление экто-АТФазы происходит главным образом за счет ее гидрофобного взаимодействия с молекулами верографина. Показано (Schulze и др., 1976), что отмывание сус-

пензии эритроцитов от контрастного вещества приводит к восстановлению начальной активности ацетилхолинэстеразы через 15 мин. На основе этих данных реально полагать, что первоначально пониженная экто-АТФазная активность лимфоцитов может восстанавливаться в ходе трехкратного промывания клеток.

Можно заключить, что выявленное в ходе градиентного центрифугирования незначительное ингибирование экто-АТФазной активности не препятствует использованию верографина для выделения лимфоцитов из крови и лимфы при изучении функции и деятельности их клеточной мембраны.

Тесты спонтанного розеткообразования, используемые для определения субпопуляционной принадлежности лимфоцитарных клеток, основываются на выявлении прикрепления гетеро-, гомо- и аутологических эритроцитов на внешней мембране исследуемых лимфоцитов. Одним из решающих этапов, определяющим достоверность получаемых результатов, является подсчет образовавшихся розеток, который может производиться с нефиксированных или фиксированных препаратов. Основным недостатком первого способа является обусловленный слабостью нативных межклеточных связей распад розеток в ходе манипулирования с ними (Elliot, Haskill, 1973), а второго — возможность возникновения «искусственных» розеток в ходе фиксирования препаратов (Долгушин, Портная, 1977). В связи с этим мы поставили перед собой задачу выяснить возможности предотвращения последнего явления при фиксировании розеток глутаровым альдегидом.

Влияние глутарового альдегида, как одного из наиболее сильных фиксаторов, основывается на образовании поперечных связей между белками (Elliot, Haskill, 1973). В наружной мембране лимфоцитов он вызывает изменения в расположении и сохранности ее составных частиц. Например, 1%-ный раствор глутарового альдегида снижает количество рецепторов Кон А на поверхности Т-лимфоцитов (Repaу-Piquegas и др., 1980). В то же время в поверхностной топологии клеток — в численности и форме покрывающих поверхность микроворсинок, существенных изменений не наблюдается. В ходе фиксирования уменьшаются и размеры клеток на 15—29% в результате обезвоживания в соответствии с осмотичностью используемого раствора (Repaу-Piquegas и др., 1980) и продолжительностью фиксирования.

С целью установления минимальной концентрации глутарового альдегида, необходимой для достижения полной устойчивости к цитолизу лимфоцитов крови барана, определяли осморезистентность нативных, а затем и обработанных слабыми растворами фиксатора клеток. Для этого в суспензию нативных лимфоцитов в забуференном физиологическом растворе (рН 7,35) добавляли дистиллированную воду до 0,043%-ной конечной концентрации NaCl и затем через определенные интервалы времени подсчитывали в камере Горяева число сохранившихся клеток. Выяснилось, что наиболее осморезистентные из них выдерживали в этих условиях до 20 мин. При 20-часовом инкубировании в растворе той же гипотоничности предварительно фиксированных (в течение 4-х часов при 4°C) 0,001 и 0,003%-ным растворами глутарового альдегида лимфоцитов сохранялось соответственно 48 и 85% клеток. Повышение концентрации фиксатора до 0,01% обеспечивало в тех же условиях фиксирование внешней мембраны всех клеток. Следовательно, можно сделать вывод, что разная осморезистентность нативных лимфоцитов, зависящая главным образом от свойств их внешней мембраны, вероятно, и является причиной различий в скорости фиксирования этих клеток, наблюдаемых и другими авторами (Repaу-Piquegas и др., 1980).

Исходя из предположения, что возникающие между поверхностями

внешних мембран лимфоцитов и эритроцитов розеточные связи, по-видимому, более доступны молекулам фиксирующего вещества по сравнению с их плазматической мембраной, то может оказаться достаточным и умеренное фиксирование. Поэтому время обработки смеси клеток после спонтанного Е-розеткообразования (Пыдер и др., 1986) в 0,01%-ном растворе глутарового альдегида мы сократили в восемь раз по сравнению с продолжительностью фиксирования мембран. Процент спонтанных Е-розеток после их 30-минутного фиксирования составлял $25,3 \pm 2,0$. При увеличении концентрации глутарового альдегида до 0,03 и 0,06% этот показатель возрастал соответственно до $30,7 \pm 1,0$ и $29,7 \pm 1,6$ %. Стабилизация результатов свидетельствует о достаточно прочном фиксировании образовавшихся розеточных связей. Так, при обработке Е-розеток 0,03%-ным глутаровым альдегидом в течение 0,5; 1; 2; 3; 4 и 20 ч выяснилось, что при такой концентрации результаты розеткообразования не зависят от продолжительности фиксирования и составляют в среднем $24,6 \pm 0,6$ %. Несколько сниженный уровень этого показателя, по сравнению с приведенными выше опытами, можно объяснить различной индивидуальной совместимостью клеток, полученных от разных особей. Таким образом, глутаровый альдегид в конечной концентрации 0,03% стабилизирует результаты розеткообразования до определенного уровня уже в течение 30 мин, причем дальнейшее увеличение продолжительности фиксирования даже до 20 ч на этот показатель не влияет.

Известно, что глутаровый альдегид в концентрациях, превышающих 1% повышает в процессе фиксирования связывание эритроцитов с лимфоцитами в тесте розеткообразования (Elliot, Haskill, 1973). В связи с этим мы прибавляли в своих опытах для достижения необходимой 0,03%-ной конечной концентрации фиксатора вместо часто используемых 2,5—3%-ных растворов (Новиков, Новикова, 1979; Понякина и др., 1983) лишь 0,17%-ный глутаровый альдегид.

Для получения дополнительных данных о влиянии глутарового альдегида на свойства лимфоцитов мы использовали проточный анализатор и сортировщик биологических материалов АТС 3000 («Odam»,

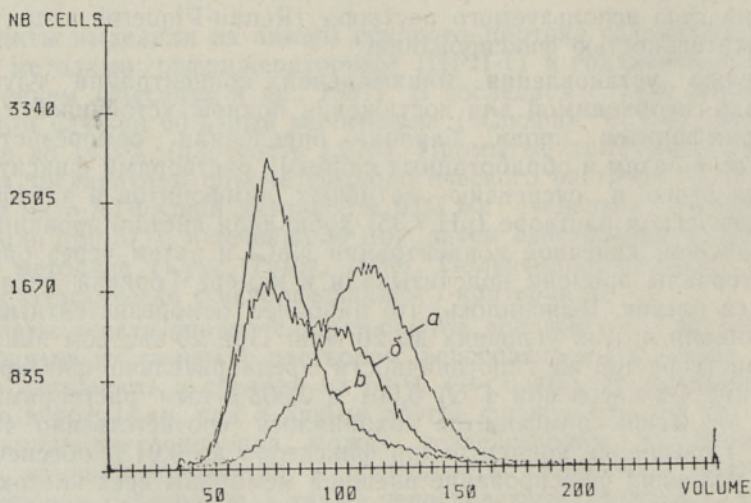


Рис. 1. Гистограммы электрически определяемого объема клеток. Здесь и на остальных рисунках каждая гистограмма содержит 10^4 клеток; по оси абсцисс — число каналов, содержащих клетки с определенными свойствами, по оси ординат — количество клеток в каждом канале; *a* — распределение нативных лимфоцитов крови, *b* — распределение фиксированных лимфоцитов крови, *в* — распределение фиксированных лимфоцитов лимфы грудного протока.

Франция) с одновременным определением мало- и широкоугольного рассеивания света аргонного лазера (488 нм) и кондуктометрическим определением объема клетки. Данные распределения клеток регистрировали автоматически на ЭВМ по электрически определяемому объему линейной шкалой (рис. 1) и по светорассеянию — логарифмической шкалой (рис. 2, 3). Для анализа использовали лимфоциты периферической крови и лимфы грудного протока барана, фиксированные в течение 3 ч при комнатной температуре в физиологическом растворе, содержащем 1% глутарового альдегида (рН 7,35). Полученные результаты сравнивали с соответствующими данными нативных лимфоцитов крови.

Данные кондуктометрии зависят от электрического сопротивления, создаваемого в капилляре протекающими лимфоцитами и связаны с

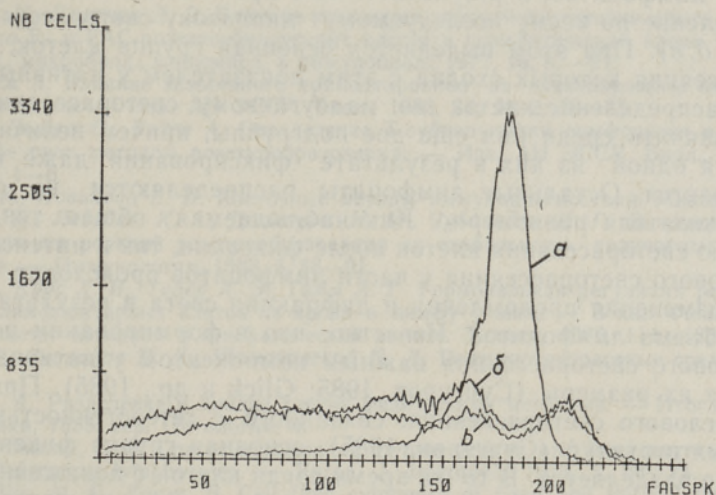


Рис. 2. Гистограммы малоугольного рассеивания света клеток.

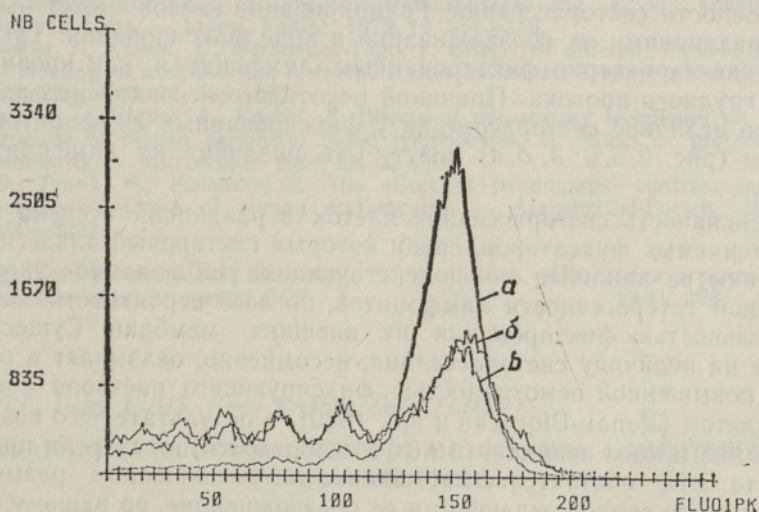


Рис. 3. Гистограммы широкоугольного рассеивания света клеток.

размерами и электропроводимостью клеток. Обстоятельство, что сопровождающее фиксацию уменьшение размеров клеток выражается и в однонаправленном изменении их электрически определяемого объема (рис. 1, а, б), дает основание думать, что эти показатели тесно связаны друг с другом. Кривые распределения, получаемые при электрическом определении объема клеток отражают также различное реагирование лимфоцитов крови на фиксирование. Избирательность миграции этих клеток из кровотока через лимфоузлы в лимфу выражается в различных кривых распределения фиксированных лимфоцитов крови и лимфы (рис. 1, б, в).

Нативные лимфоциты характеризовались способностью светорассеяния в относительно узких пределах (рис. 2, а; 3, а). Обработка 1%-ным глутаровым альдегидом существенно изменяла оптические свойства лимфоцитов, в результате чего происходило более ровное их распределение по всему исследуемому диапазону светорассеяния (рис. 2, б, в; 3, б, в). При этом выделяется основная группа клеток, величина светорассеяния которых сходна с этим показателем у нативных лимфоцитов. Распределение клеток по малоугловому светорассеянию позволяет различить среди них еще две подгруппы, причем величина светорассеяния одной из них в результате фиксирования даже несколько увеличивается. Остальные лимфоциты распределяются на основании этого показателя равномерно. Как наблюдаемая общая тенденция к снижению светорассеяния клеток после фиксации, так и интенсификация малоуглового светорассеяния у части лимфоцитов происходят, вероятно, за счет изменения преломления и дифракции света в результате уменьшения объема лимфоцитов. Известно, что в формировании показателя малоуглового светорассеяния важным компонентом у нативных клеток являются их размеры (Сунгуров, 1985; Glick и др., 1985). При помощи широкуюглового светорассеяния, связанного с гетерогенностью внутриклеточных структур (Сунгуров, 1985), основная группа фиксированных клеток не разделяется. В то же время среди клеток с пониженным светорассеянием этим способом можно выделить целый ряд подгрупп (рис. 3, б, в). Следовательно, в процессе фиксирования оптическая неоднородность клеток должна усугубляться при одновременном уменьшении их способности светорассеяния. Группирование клеток может быть связано с различиями их обезвоживания в ходе фиксирования. Такое распределение характерно фиксированным лимфоцитам как крови, так и лимфы грудного протока. Причиной некоторого несовпадения распределения по величине светорассеяния у фиксированных лимфоцитов крови и лимфы (рис. 2, б, в; 3, б, в) могут быть различия их лимфоцитарного состава.

Интенсивность светорассеяния клеток в различной степени зависит от применяемых фиксаторов, среди которых глутаровый альдегид является одним из наиболее сильнодействующих. Наблюдаемое увеличение оптической гетерогенности лимфоцитов, по всей вероятности, связано с вариабельностью фиксирования их внешних мембран. Существенное влияние на величину светорассеяния, несомненно, оказывает и обусловленное повышенной осмотичностью фиксирующего раствора обезвоживание клеток (Renau-Piquegas и др., 1980), в результате чего возрастает содержание сухого вещества в них и изменяются показатели преломления света. Эти обстоятельства, вместе с уменьшением размеров и объема клетки сопровождающими ее обезвоживанием, по нашему мнению являются главными причинами изменения показателей светорассеяния. Более детальную интерпретацию полученных результатов затрудняет участие в образовании показателей светорассеяния многих структур клетки, о влиянии каждой из которых на ее оптические свойства имеется еще мало данных. В то же время необходимо отметить, что фиксирова-

ние лимфоцитов несомненно увеличивает информативность используемых методов.

Следовательно, можно заключить, что при обработке лимфоцитов глутаровым альдегидом даже в относительно умеренных концентрациях, в структурах этих клеток происходят резкие изменения, которые можно уменьшить при снижении концентрации реагирующего вещества до оптимального уровня.

Авторы благодарят старшего научного сотрудника лаборатории молекулярной генетики Института химической и биологической физики А. Пихлака за любезную помощь при проведении проточной лазерной цитометрии.

ЛИТЕРАТУРА

- Долгушин И. И., Портная Л. В. Влияние некоторых условий постановки опыта на количество Е- и ЕАС-розеткообразующих клеток в периферической крови человека. — Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., 1977, 10, 87—91.
- Куус Х., Тамм А. Влияние экзогенного трийодтиронина на эктоапиразную активность лимфоцитов. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1982, 31, № 2, 79—85.
- Месипуу И., Пыдер О., Тедер А. Определение Т-субпопуляции лимфоцитов в крови и лимфе овец методом розеткообразования. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1981, 30, № 1, 1—6.
- Новиков Д. К., Новикова В. И. Клеточные методы иммунодиагностики. Минск, 1979.
- Понякина И. Д., Лебедев К. А., Дозморов И. М., Чубинидзе Н. Г. Влияние условий постановки реакций розеткообразования на стабильность получаемых результатов. — Иммунология, 1983, 5, 88—91.
- Пыдер О. О., Куус Х. В., Тедер А. Э., Тамм А. Г. Гормональная регуляция рециркуляции лимфоцитарных клеток из крови в лимфу у овец. — В кн.: Физиология и патология венозной и лимфатической систем. Таллин, 1986, 114—126.
- Сергеев П. В., Свиридов Н. К., Шимановский Н. Л. Рентгеноконтрастные средства. М., 1980.
- Сунгуров Ю. А. Разделение и анализ клеток физическими методами. — Итоги науки и техники, 1985, сер. Цитология, 4.
- Elliot, B. E., Haskill, J. S. Characterization of thymus-derived and bone-marrow derived rosetteforming lymphocytes. — Europ. J. Immunol., 1973, 3, 68—74.
- Glick, B., LaVia, M. F., Koger, B. Cell flow cytometry of fixed and unfixed bursal and thymic cells. — Poultry Science, 1985, 64, 737—743.
- Lang, J., Lasser, E. Nonspecific inhibition of enzymes by organic contrast media. — J. Med. Chem., 1971, 14, 233—236.
- Lang, J., Lasser, E. Inhibition of adenosine triphosphatase and carbonic anhydrase by contrast media. — Invest. Radiol., 1975, 10, 314—316.
- Renau-Piqueras, J., Knecht, E., Hernandez-Yago, J. Effects of different fixative solutions on labeling of concanavalin-A receptor sites in human T-lymphocytes. — Histochemistry, 1981, 71, 559—565.
- Renau-Piqueras, J., Miguel, A., Knecht, E. Effects of preparatory techniques on the fine structure of human peripheral blood lymphocytes. II. Effect of glutaraldehyde osmolarity. — Microscopie, 1980, 36, 65—80.
- Schulze, B., Trunk, P., Vielhauer, E. The effect of tri-iodinated contrast media on acetylcholinesterase of human erythrocytes. — Arzneimittel-Forsch., 1976, 26, 2199—2202.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
28/IV 1987

Olev PÖDER, Helgi KUUS, Anna TAMM, Aade TEDER

VEROGRAFIINI JA GLUTAARALDEHÜÜDI MÕJU LAMBA LÜMFOTSÜÜTIDE PINNAOMADUSTELE

Verografiini ja glutaaraldehüüdi on kasutatud vastavalt lümfotsüütide eraldamiseks verest ja lümfist ning rakkude ja E-rosettide fikseerimiseks.

Kõik röntgenkontrastsed ühendid muudavad vahetul kokkupuutel paljude fermentide, sealhulgas ka ATPaaside aktiivsust. On selgitatud, kas ja millises ulatuses mõjutab verografiini lamba lümfotsüütide pinnafermenti ekto-ATPaasi aktiivsust lümfis gradienttsel tsentrifuugimisel. Katsed näitasid, et verografiini võib edukalt kasutada lümfotsüütide eraldamiseks verest ja lümfist ilma rakkude välispinna olulise kahjustuseta.

Uurides glutaaraldehüüdi nõrkade lahuste fikseerivat toimet jäära lümfotsüütidele tuvastati E-rosettides rakkude vahele moodustuvate sidemete kaheksakordselt kiirem fikseerumine, võrreldes lümfotsüütide kogu plasmaatilise membraaniga. Lümfotsüütide erinevaid fikseerumiskiirusi on seletatud nende loomuliku osmoresistentsuse varieeruvusega. Fikseeritud lümfotsüütide lasertsütomeetriliselt määratud elektrilise mahu ning valguse hajutamise võime oluliste muutuste peamise põhjusena on toodud esile rakkude veetustamisest tingitud kuivainesalduse tõus. Ühtlasi süvendab glutaaraldehüüdiga töötlemine tunduvalt lümfotsüütide optilist heterogeensust.

Olev PÖDER, Helgi KUUS, Anna TAMM, Aade TEDER

EFFECT OF VEROGRAFIN AND GLUTARALDEHYDE ON THE SURFACE QUALITY OF SHEEP LYMPHOCYTES

Verografin and glutaraldehyde are used for separation of lymphocytes from blood and lymph and for fixation these cells and E-rosettes, respectively.

It is known that verografin like all radiographic contrast agents reduce the activity of the majority of enzymes including ATPases in direct contact. Ecto-enzymes located on the external surface of the plasma membranes may be involved in the changes of the cell surface properties during their isolation procedure. The results demonstrate a negligible inhibition (5.6%) of ecto-ATPase activity of sheep lymphocytes during their separation from lymph by density gradient centrifugation with verografin. The experiments revealed that verografin is a suitable media for the isolation of lymphocytes from blood and lymph without the essential damage of their plasma membranes.

The effect of diluted solutions of glutaraldehyde on external surface of lymphocyte membranes was investigated in the course of their fixation. It was inferred from the results that the bands formed between cells in E-rosette tests were fixed considerably faster than the plasma membrane of all the lymphocytes, and the differences in the velocity of fixation of lymphocytes were connected with the variety of their natural osmotic resistance. The experiments have shown that treating the cells with 0.03% glutaraldehyde solution during 30 min guaranteed the conditions of minimal fixation of stable E-rosettes.

The dehydration of lymphocytes during fixation changed essentially their flow cytometry parameters. The distribution of fixed cells on the basis of electric volume was in accordance with their distribution on the ground of their size in the blood and lymph. After the fixation of the lymphocytes there was observed a series of cell groups on the ground of changes in their wide and forward angle light scattering ability.

Therefore the data obtained indicate that the fixation of lymphocytes with glutaraldehyde increases noticeably the separation ability of cytometry and enlarges analytical possibilities of ATC 3000 — a flow analyser and sorter of biological materials (Odam, France).