

© Коллектив авторов, 2011
УДК 611.018.53:599.742.4

Л.Б. Узенбаева¹, А.Г. Кижина¹, В.А. Илюха^{1,2} и Н.Н. Тютюнник¹

АНОМАЛЬНЫЕ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ ГРАНУЛЫ В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ У НОРОК САФИРОВОГО ОКРАСА (ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ И ЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

¹ Лаборатория экологической физиологии животных (зав. — д-р биол. наук В.А. Илюха), Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск; ² кафедра молекулярной биологии, биологической и органической химии (зав. — чл.-кор. РАН Н.Н. Немова), Петрозаводский государственный университет

Проведено детальное морфологическое и цитохимическое исследование лейкоцитов крови у норок трех генотипов — темно-коричневой ($n=10$), близкой по окрасу к дикому типу, мутантной серебристо-голубой (p/p) ($n=10$) и комбинативной формы — сапфировых ($a/a\ p/p$) ($n=10$). Показано, что у сапфировых норок наблюдается наследственный дефект гранул лейкоцитов, содержащих пероксидазу, неспецифические эстеразы и неферментный катионный протеин. Эти гранулы имеют аномально большие размеры; в цитоплазме нейтрофилов встречаются одна или несколько таких гранул, они множественные в эозинофилах и базофилах, единичные — в лимфоцитах и моноцитах. Морфологические и цитохимические признаки указывают на сходство наследственной патологии лейкоцитов у сапфировых норок с синдромом Чедиака—Хигаши у человека.

Ключевые слова: лейкоциты, цитохимия, ферменты, норка, синдром Чедиака—Хигаши

Известно, что мутации генов, определяющих окраску меха животных, могут приводить к морфофункциональным нарушениям, проявляющимся на клеточном, тканевом и организменном уровне. Так, при доместикации американской норки (*Mustela vison* Schr.), хищного млекопитающего из семейства кунных, было получено большое число цветных форм, различающихся по пигментации волосяного покрова. У некоторых из них обнаружена аномалия лейкоцитов крови, костного мозга и клеток различных тканей, сходная с редким наследственным заболеванием человека — синдромом Чедиака—Хигаши (СЧХ). Клеточный дефект наиболее изучен у мутантных, цвета ворононой стали, алеутских норок, в генотипе которых содержится в гомозиготном состоянии ген алеутского окраса (a/a). Аналогичная генетическая патология выявлена у бежевых мышей и крыс, герефордской и черной японской пород крупного рогатого скота, лисиц жемчужной Мансфилда и сапфировой, песцов арктик блу, персидских кошек и дельфинов-косаток [2, 10, 15, 16].

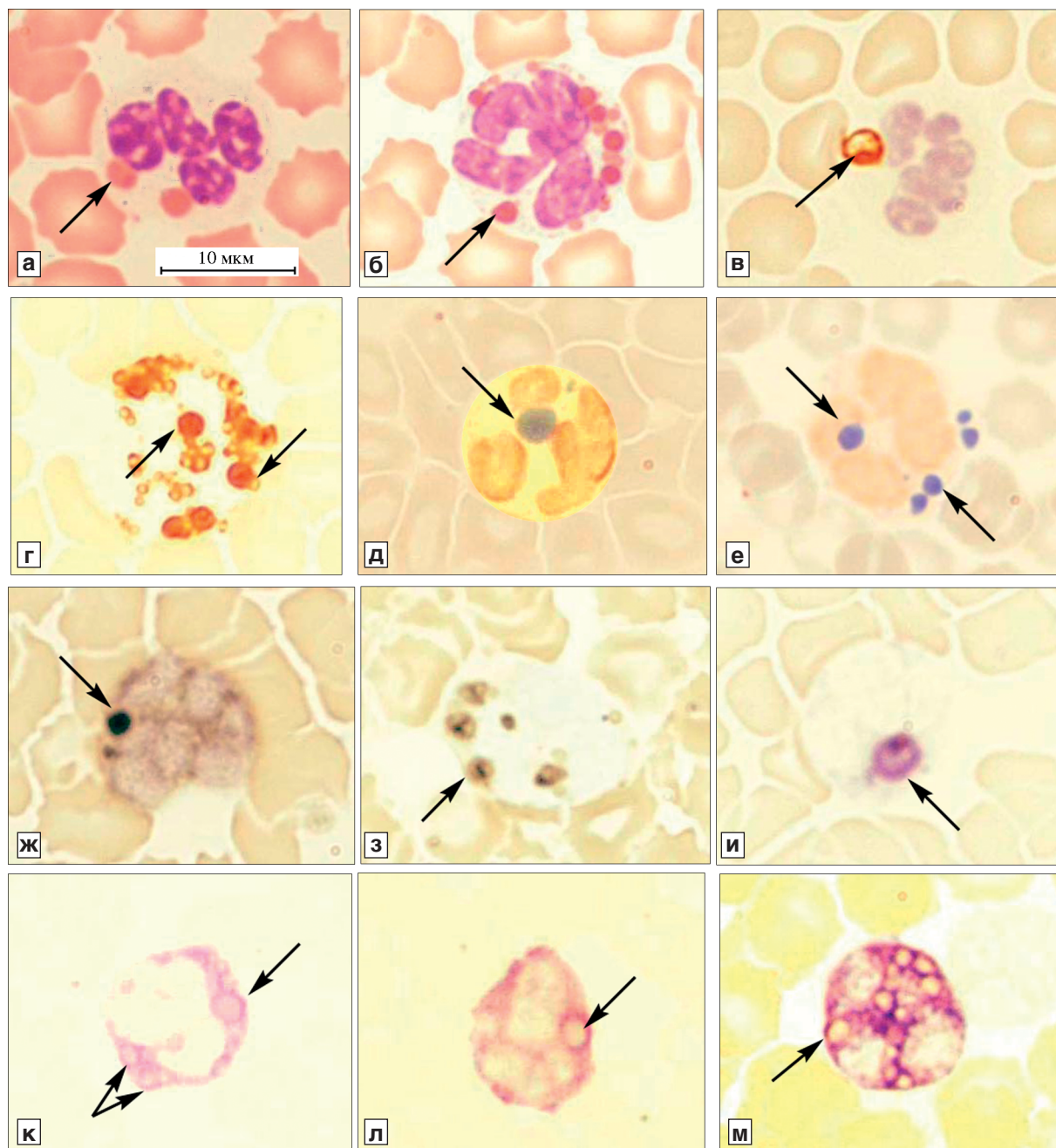
Данные о нарушении структуры лейкоцитов у животных при аномалии, сходной с СЧХ, в отечественной литературе отсутствуют. Имеются лишь единичные сведения о патогенезе данного заболевания у человека [5] и ссылки на исследования зарубежных авторов [6, 9]. Вместе с тем, применение современных морфологических методов позволяет оценить структуру и метаболизм лейкоцитов в норме и при патологии [4, 7].

Цель настоящей работы — сравнительное изучение цитологических и цитохимических осо-

бенностей лейкоцитов у сапфировых норок, отличающихся от других генотипов повышенной чувствительностью к некоторым заболеваниям, низкой жизнеспособностью и нарушением механизма функционирования меланосом, отражающимся на характере пигментации волосяного покрова.

Материал и методы. Работа выполнена на норках, содержащихся на звероводческой ферме Республики Карелия: стандартных темно-коричневых ($n=10$), окраска меха которых определяется генотипом дикого типа и цветных из голубой группы — серебристо-голубых ($n=10$) и сапфировых ($n=10$). У мутантных серебристо-голубых норок, рецессивных по гену серебристо-голубого окраса (p/p), цвет варьирует от светло- до темно-серого. Сапфировая, одна из самых красивых голубых норок, представляет комбинативную форму, являющуюся дирекцессивной ($a/ap/p$) по генам серебристо-голубой (p/p) и алеутской окрасок (a/a).

Цитологический анализ лейкоцитов проводили на окрашенных по Паппенгейму мазках крови, которую получали из хвостовой вены. В цитохимических исследованиях использовали рекомендации, представленные в соответствующих монографиях и руководствах [1, 3, 11, 12]. Для выявления щелочной фосфатазы (ЩФ), нафтол-AS-D-хлорацетат-эстеразы и пероксидазы мазки крови фиксировали в 10% спиртовом растворе формалина в течение 30 с, гликогена — 30 мин. Фиксацию мазков для реакций на альфа-нафтилацетатэстеразу осуществляли в парах формалина 4 мин, на катионный белок — в 5% растворе сульфосалициловой кислоты — 90 с. В качестве субстрата для выявления ЩФ при pH 9,0–9,2 использовали нафтол-АС-фосфат (Chemapol, Чехия), альфа-нафтилацетатэстеразу выявляли при pH 7,8–8,0 с альфа-нафтилацетатом (Chemapol, Чехия), нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразу при pH 7,2–7,4 — с нафтол-AS-D-хлорацетатом (Chemapol, Чехия). Красителем в цитохимических реакциях служил прочный синий ВВ (MP Biomedicals, США). Пероксидазу выявляли орто-толидином



Лейкоциты крови у норок сапфирового окраса.

а, б — нейтрофил и эозинофил, окраска по Паппенгейму; в — пероксидаза в нейтрофиле; г — в эозинофиле; д — катионный белок в нейтрофиле; е — в эозинофиле; ж — альфа-нафтилацетатэстераза в нейтрофиле; з — в эозинофиле; и — нафтол-AS-D-хлор-ацетатэстераза в нейтрофиле; к — гликоген в эозинофиле; л — в нейтрофиле; м — щелочная фосфатаза в эозинофиле; стрелки — аномальные гранулы; в, ж — ядра докрашены гематоксилином; д, е — нейтральным красным.

(MP Biomedicals, США). Катионный белок выявляли отечественным красителем бромфеноловым синим, гликоген — с помощью ШИК-реакции. В некоторых случаях ядра докрашивали гематоксилином или нейтральным красным. В исследованиях использовали световой микроскоп Axioscop 40 (Carl Zeiss, Германия) с компьютерной системой анализа изображений с цветной цифровой видеокамерой (Pixera 150ES, Carl Zeiss, Германия) и программным обеспечением «Видеотест». Работа выполнена с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным.

Результаты исследования. Лейкоциты темно-коричневых и серебристо-голубых норок имеют структуру, свойственную другим видам млекопитающих. В нейтрофилах наблюдаются мелкие пылевидные гранулы, в эозинофилах и базофилах — характерная специфическая зернистость, в лимфоцитах, как правило, гранулы отсутствуют. В лейкоцитах у сапфировых норок обнаружены аномально большие гранулы — одна

или несколько в нейтрофилах, множественные в эозинофилах и базофилах, единичные в лимфоцитах и моноцитах (рисунок, а, б). Величина их, а иногда форма и внутренняя структура широко варьируют. Особенно наглядно изменение строения выражено в эозинофилах, содержащих небольшое количество «гигантских» гранул (см. рисунок, б).

Пероксидаза (Н.Ф.1.11.1.7) в нейтрофилах у темно-коричневых и серебристо-голубых норок, так же как и у других видов млекопитающих, выявляется в виде мелких обильных гранул, в эозинофилах — крупных, соответствующих специфической зернистости. Нейтрофилы у норок сапфирового окраса содержат одну или несколько аномально увеличенных гранул, имеющих сложную, неоднородную, структуру (см. рисунок, в). Эозинофилы значительно различаются между собой по количеству пероксидазопозитивных гранул, которые неодинаковы по величине, а иногда и по форме. В отдельных случаях в эозинофилах имеется лишь одна гранула, видны признаки слияния, ламеллярные структуры и полая сфера (см. рисунок, г).

Неферментный катионный протеин у норок исследованных окрасов выявлен в нейтрофилах и эозинофилах. В нейтрофилах у сапфировых норок, в отличие от темно-коричневых и серебристо-голубых, катионный белок обнаружен так же, как и пероксидаза, как правило, в одной, а в эозинофилах — в нескольких увеличенных гранулах (см. рисунок, д, е).

Характер распределения лизосомальных ферментов — эстераз (Н.Ф. 3.1.6) у норок сапфирового окраса также не соответствует таковому у других норок. Активность альфа-нафтилацетат-эстеразы в нейтрофилах у темно-коричневых и серебристо-голубых норок выражена слабо и отсутствует в эозинофилах. У сапфировых норок в нейтрофилах продукт реакции представлен в виде крупных гранул, равномерного окрашивания цитоплазмы и сочетания крупногранулярной и диффузной формы (см. рисунок, ж). В некоторых, особенно аномально больших гранулах эозинофилов у сапфировых норок отмечена слабая активность альфа-нафтилацетатэстеразы (см. рисунок, з).

У норок всех исследованных окрасов еще один фермент лизосом — нафтол-AS-D-хлорацетат-эстераза выявлен в нейтрофилах и отсутствует в эозинофилах. У сапфировых норок активность хлорацетатэстеразы так же, как и пероксидазы, альфа-нафтилацетатэстеразы и катионный белок локализованы в увеличенных гранулах нейтрофильных лейкоцитов (см. рисунок, и).

У сапфировых норок во внутриклеточном распределении гликогена и ЩФ, так же как и других соединений, имеются особенности. В аномальных гранулах не обнаружен гликоген и отсутствует активность ЩФ (см. рисунок, к–м). Реакция на ЩФ у норок положительна только в незначительной части лейкоцитов, по морфологическим признакам являющихся эозинофилами.

Обсуждение полученных данных. Наличие в разных типах лейкоцитов крови сапфировых норок гигантских гранул может быть обусловлено нарушением процессов их биогенеза и созревания. В аномальный гранулогенез вовлекаются пероксидазо- и эстеразоположительные гранулы, а также содержащие катионный протеин. Проведенный цитохимический анализ и данные литературы показывают, что в нейтрофилах аномальные гранулы соответствуют азурофильным, или так называемым первичным гранулам [7]. В частности, этот вывод подтверждается распределением в нейтрофилах лизосомальных ферментов и миелопероксидазы, являющейся маркером первичных гранул. По цитохимическому составу аномальные гранулы в эозинофилах соответствуют специфическим.

Распределение в гранулоцитах у сапфировых норок соединений, не относящихся к лизосомальным — гликогена и ЩФ, зависит от расположения и величины аномальных гранул. Гликоген у норок этого генотипа и в нейтрофилах, и в эозинофилах занимает пространство между аномальными гранулами. По мнению некоторых авторов, такая локализация свидетельствует о том, что аномальные гранулы не относятся к вторичным лизосомам, а образуются в процессе созревания клеток в костном мозгу [13].

Цитохимический анализ лейкоцитов имеет большое значение для изучения отдельных субпопуляций гранул и приобретает особую роль при патологических изменениях. Вследствие укрупнения гранулы в лейкоцитах крови у сапфировых норок являются удобной моделью для исследования их структуры даже на светооптическом уровне. Некоторое время дискутировался вопрос о принадлежности азурофильных гранул к лизосомам или особым органеллам — пероксидазомам, содержащим пероксидазу [8]. Анализ данных показал, что в лейкоцитах у сапфировых норок гранулы огромного размера относятся к пероксидазо- и эстеразопозитивным и содержат катионный протеин. Согласно биохимическим и цитохимическим исследованиям, в аномальных гранулах у бежевых мышей, пациентов с СЧХ и норок с геном алеутского окраса (*a/a*) обнаружен

маркерный фермент лизосом — кислая фосфатаза [16].

На процесс формирования аномальных гранул в лейкоцитах у сапфировых норок негативно влияет мутация в локусе (*a/a*), поскольку ни у темно-коричневых, близких к исходному дикому типу, ни у мутантных серебристо-голубых норок нарушений не выявлено. Кроме гранулогенеза, ген алеутского окраса вызывает изменения строения и функции меланосом — клеточных органелл, родственных лизосомам, что находит выражение в характере пигментации. Если в волосе у темно-коричневых и серебристо-голубых норок имеются относительно однородные гранулы пигмента, то у сапфировых — обнаружено их увеличение и значительная вариабельность формы и размера.

Несмотря на сходство цитологических, цитохимических признаков и молекулярных механизмов клеточного дефекта при СЧХ и аналогичном заболевании у животных, обнаружены межвидовые особенности, что может быть причиной различий в их устойчивости. В частности, при СЧХ-подобной патологии в нейтрофилах у крыс и мышей отмечена примерно одинаковая легкая степень нарушения их строения, но различная в эозинофилах — высокая у крыс и средняя у мышей [16]. Деструктивный эффект аллеля *a/a* может модифицироваться генетическим окружением, что обуславливает степень дефекта гранул у норок различных цветовых форм, полученных при скрещивании с алеутской норкой [10].

Молекулярно-генетические аспекты патологических изменений лейкоцитов при СЧХ у человека и СЧХ-подобной аномалии у животных изучены недостаточно. Исходя из результатов исследований различных типов клеток — фибробластов, меланоцитов и лейкоцитов, была предложена модель, в которой важная роль отведена белку, принимающему участие в транспорте пузырьков [15]. Вследствие его отсутствия или недостатка пузырьки из трансзоны комплекса Гольджи не в состоянии перемещаться вдоль микротрубочек и впоследствии соответственно сливаться с лизосомами. Нарушение транспорта и накопление пузырьков в перинуклеарном пространстве приводит к тому, что образуются их огромные конгломераты, а в лизосомах выявлено уменьшение количества, по сравнению с нормой, специфических мембранно-связанных белков [14].

Таким образом, полученная в процессе доместикировки норок алеутская мутация (*a/a*) привела к изменению пигментации волосяного покрова и к аномалии структуры лейкоцитов — возникновению гигантских гранул. В лейкоцитах крови у сапфировых норок, являющихся носителями

аллеля (*a/a*) в гомозиготном состоянии, наблюдаются увеличенные гранулы, которые содержат лизосомальные ферменты, катионный протеин и пероксидазу. Наличие видоизмененных гранул в лейкоцитах дает возможность использовать норок с геном алеутского окраса, в том числе и сапфировых, в качестве модельных животных для изучения клеточной биологии и патологии, и механизмов системы внутриклеточного везикулярного транспорта.

Работа выполнена в рамках Гранта Президента РФ НШ-3731.2010.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берстон М. Гистохимия ферментов. М., Мир, 1965.
2. Голубева А.Г., Узенбаева Л.Б., Илюха В.А. и Тютюнник Н.Н. Дефект лейкоцитов у разводимых в условиях фермы пушных зверей. Кролиководство и звероводство, 2010, № 4, с. 25–27.
3. Кисляк Н.С. и Ленская Р.В. Клетки крови у детей в норме и при патологии. М., Медицина, 1978.
4. Козинец Г.И., Погорелов В.М., Шмаров Д.А. и др. Клетки крови — современные технологии их анализа. М., Триада-фарм, 2002.
5. Масчан А.А., Богачева Н.Ю., Куликова О.В. и др. Гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз при синдроме Чедиака—Хигаши. Гематол. и трансфузиол., 1997, т. 42, № 2, с. 44–47.
6. Маянский А.Н. и Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск, Наука, 1989.
7. Погорелов В.М., Козинец Г.И., Дягилева О.А. и Проценко Д.Д. Цветной атлас клеток системы крови (один источник и четыре составные части миелопоэза). М., Практическая медицина, 2007.
8. Роговин В.В., Пирузян Л.А. и Муравьев Р.А. Пероксидазосомы. М., Наука, 1977.
9. Тотолан А.С. и Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы. СПб., Наука, 2000.
10. Узенбаева Л.Б., Трапезов О.В., Кижина А.Г. и др. Влияние мутаций, затрагивающих окраску меха, на структуру лейкоцитов крови у американской норки (*Mustela vison* Schreber, 1777). Генетика, 2011, т. 47, № 1, с. 87–94.
11. Хейхоу Ф.Г. и Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. М., Медицина, 1983.
12. Шубич М.Г. и Нагоев Б.С. Щелочная фосфатаза лейкоцитов в норме и патологии. М., Медицина, 1980.
13. Hamaoka S.C., Gilbert H.S., White D.A. and Parmley R.T. Ultrastructural morphology cytochemistry, and morphometry of eosinophil granules in Chediak-Higashi syndrome. Am. J. Pathol., 1993, v. 143, № 2, p. 618–627.
14. Huizing M., Helip-Wooley A., Westbroek W. et al. Disorders of lysosome-related organelle biogenesis: clinical and molecular genetics. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., 2008, v. 9, p. 359–386.
15. Introne W., Boissy R.E. and Gahl W.A. Clinical, molecular, and cell biological aspects of Chediak-Higashi syndrome. Mol. Genet. Metab., 1999, v. 68, № 2, p. 283–303.
16. Ozaki K., Maeda H., Nishikawa T. et al. Chediak-Higashi syndrome in rats: light and electron microscopical characterization of

abnormal granules in beige rats. J. Comp. Pathol., 1994, v. 110, № 4, p. 369–379.

Поступила в редакцию 04.04.2011

MORPHOLOGY AND CYTOCHEMISTRY OF ABNORMAL CYTOPLASMIC GRANULES IN BLOOD LEUKOCYTES IN SAPPHIRE MINKS (CYTOLOGICAL AND CYTOCHEMICAL STUDY)

L.B. Uzenbayeva, A.G. Kizhina, V.A. Iliukha and N.N. Tiutiunnik

Detailed morphological and cytochemical investigation of blood leukocytes was performed in minks of three genotypes: dark-brown minks (n=10), which had the color resembling

that of the wild type, mutant silver-blue (p/p) minks (n=10), and sapphire minks (a/a p/p) (n=10). The sapphire minks were demonstrate to have a hereditary defect of leukocyte granules containing peroxidase, nonspecific esterases and non-enzymatic cationic protein. These granules have abnormally large size, the neutrophil cytoplasm contains one to several abnormal granules, they are numerous in eosinophil and basophil cytoplasm and rare in lymphocytes and monocytes. Morphological and cytochemical features indicate the similarity of hereditary leukocytes pathology of sapphire mink with that one found in human Chediak-Higashi syndrome.

Key words: leukocytes, cytochemistry, enzymes, mink, Chediak–Higashi syndrome

Institute of Biology, RAS Karelian Scientific Center, Petrozavodsk State University

© Е.А. Иванова, 2011
УДК 611.428:616.8-008.615:599.323.4

Е.А. Иванова

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ГЕРМИНАТИВНЫХ ЦЕНТРОВ АГРЕГИРОВАННЫХ ЛИМФОИДНЫХ УЗЕЛКОВ ТОНКОЙ КИШКИ И БРЫЖЕЕЧНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ПОСЛЕ ОСТРОГО ЭМОЦИОНАЛЬНОГО СТРЕССА

Кафедра анатомии человека (зав. — академик РАМН проф. М.Р. Сапин), Первый Московский медицинский университет им. И.М. Сеченова, e-mail: elena.al.ivanova@gmail.com

В физиологическом состоянии у взрослых крыс-самцов линии Вистар площади герминативных центров (ГЦ) лимфоидных узелков тонкой кишки были больше, чем аналогичные структуры в брыжеечных лимфатических узлах. При этом данные различия в группе стрессоустойчивых крыс более выражены по сравнению со стресс-предрасположенными особями. Воздействие острого эмоционального стресса (иммобилизация в плексигласовых боксах в течение 1 ч с раздражением области спины электрическим током) приводила к уменьшению размеров площадей ГЦ. Восстановление изученных морфометрических показателей в группе стрессоустойчивых крыс завершилось в более ранние сроки (к 3-м суткам после стрессорного воздействия), а у предрасположенных животных — к 7-м суткам. К 14-м суткам после острого эмоционального стресса в группе устойчивых крыс размеры площадей ГЦ соответствовали контрольным показателям, а у предрасположенных животных — были ниже исходных, что указывает на истощение функциональных возможностей лимфоидной ткани у данной группы животных.

Ключевые слова: агрегированные лимфоидные узелки, брыжеечные лимфатические узлы, герминативные центры, острый эмоциональный стресс, крысы Вистар

В развитии адаптивных реакций при стрессорных воздействиях ключевую роль играют интегративные системы: нервная, эндокринная и иммунная [4, 5, 12, 13]. Наиболее крупным периферическим отделом иммунной системы является кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань (КАЛТ) [3, 6, 11]. Иммунные структуры, ассоциированные со слизистой оболочкой тон-

кой кишки, расцениваются как первый барьер, готовый оказать иммунную защиту в случае антигенного воздействия на слизистую оболочку. Вторым таким барьером являются регионарные брыжеечные лимфатические узлы [11]. К особенностям иммунных структур тонкой кишки относят наличие агрегированных лимфоидных узелков (АЛУ) [2]. Известно, что при активации