



Г.П. Никитюк, І.М. Лукович, Б.М. Вервега

Електронно-мікроскопічні дослідження та показники ферментативних процесів нейтрофілів за умов довготривалого антигенного навантаження та на тлі введення кверцетину

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

Мета роботи — вивчити морфологічні й ферментативні зміни в нейтрофільних гранулоцитах за умов хронічного імунотоксичного процесу та при введенні кверцетину.

Матеріали та методи. Наведено результати, одержані у двох групах тварин (щурів): перша — з хронічним імунотоксичним процесом, друга — з хронічним імунотоксичним процесом та введенням розчину кверцетину. Для відтворення моделі хронічної сироваткової хвороби обрали модель, запропоновану С.С. Cochrane, у модифікації С.В. Wilson та співавт. Кверцетин вводили по 4 мг/100 г доочеревинно 1 раз на добу, курсом 10 днів. Нейтрофіли виділяли із крові методом центрифугування на градієнті щільності фікол-верографіну за методом І.В. Петрової. Захоплювальну функцію нейтрофілів вивчали з допомогою латексного тесту, ферментативну здатність — за допомогою мієлопероксидазного тесту, лізосомально-катіонного тесту та нітросинього тетразолієвого тесту.

Результати та обговорення. Встановлено, що в умовах хронічного імунотоксичного процесу активуються ферментативні процеси в нейтрофільних гранулоцитах. При застосуванні кверцетину морфологічні та ферментативні вияви активації стають менш вираженими.

Висновки. Кверцетин має стабілізаційний вплив на продукцію циркулюючих імунних комплексів, позитивно впливає на ферментативні процеси в нейтрофілах та захоплення чужорідних частинок.

Ключові слова: нейтрофіли, хронічний імунотоксичний процес, кверцетин, електронна мікроскопія.

Нейтрофіли (НФ) — ключові клітини, які беруть участь у реалізації та регуляції реакцій імунної системи. Вони багаті ферментними й неферментними білками, які локалізовані в цитоплазматичних гранулах трьох типів і везикулах. НФ беруть участь у реалізації як фагосомального, так й екстрацелюлярного кілінгу, деструкції та елімінації бактеріальних і вірусних патогенів [1—5, 7, 9, 18, 19]. НФ, які нормально функціонують, при контакті з патогенами одними з перших реагують ранню стереотипну адекватну відповідь, що виражається в активації рецепторного апарату, підвищенні фагоцитарної активності, а також активності мікробіцидності компонентів гранул, підвищенні продукції активних форм кисню. Існують переконливі дані, які свідчать про те, що на тлі різних дисфункцій НФ вродженого й набутого характеру виникають різні патологічні процеси [2, 7, 10, 11, 14, 18].

Хронічна сироваткова хвороба характеризується активацією НФ під впливом циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) та системи комплементу [2, 11, 14, 15, 17, 18]. Знищення чужорідних частинок відбувається внаслідок дії кисневозалежного та кисневонезалежного механізмів бактерицидного захисту. НФ, що циркулюють у крові, містять у своїй цитоплазмі від кількох сотень до тисяч різноманітних за морфологічними властивостями гранул [13]. Азурофільні гранули НФ містять гідролітичні ферменти. До них входить мієлопероксидаза, і тому ці гранули ще називають пероксидазовмішувальними. Мієлопероксидаза визначає наявність у НФ кілька мієлопероксидазозалежних антимікробних систем. Специфічні (вторинні) гранули містять лужну фосфатазу, лактоферин, лізоцим, низку неферментних катіонних білків, колагеназу, протеїни, які беруть безпосередню участь в основних біологічних функціях НФ [2, 4, 13, 14, 18].

Мета роботи — вивчити морфологічні й ферментативні зміни в нейтрофільних гранулоцитах за умов хронічного імунотоксичного процесу та при введенні кверцетину (К).

Матеріали та методи

Наведено результати, одержані у двох групах тварин (щурів): перша — з хронічним імунотоксичним процесом, друга — з хронічним імунотоксичним процесом та введенням розчину кверцетину.

Стаття надійшла до редакції 10 липня 2013 р.

Никитюк Галина Петрівна, к. мед. н., доцент кафедри патологічної фізіології
79010, м. Львів, вул. Пекарська, 69
Тел. (032) 278-64-50
E-mail: gnykytiuk@rambler.ru

комплексним процесом, друга — з хронічним імунокомплексним процесом та введенням розчину К. Для відтворення моделі хронічної сироваткової хвороби ми обрали модель, запропоновану С.С. Cochrane у модифікації С.В. Wilson і співавт. К уводився по 4 мг / 100 г доочеревино 1 раз на добу, курсом 10 днів. НФ виділялись із крові методом центрифугування на градієнті щільності фікол-верографіну за методом І.В. Петрової (1983) [12]. Гранулоцити в суспензії склали 98 %. Відмивали в буфері Хенкса (без іонів Са і Mg), фіксували в 4 % параформальдегіду на буфері Хенкса та дофіксували в 1 % чотириокису осмію. Обезводнювали на ацетоні й поміщували в суміш смол епону-аралдиту. Ультратонкі зрізи готували на ультратомі LKB-IV і після контрастування ураніл-ацетатом і цитратом свинцю дивились на електронному мікроскопі. Інкубацію проводили при 37°C — 60 хв у вологій камері з підвищеним вмістом вуглекислого газу. Функцію захоплення в НФ вивчали з допомогою латексного тесту (ЛТ) [8]. Ферментативну здатність НФ досліджували з допомогою мієлопероксидазного тесту (МПТ) [6], лізосомально-катіонного тесту (ЛКТ) [6], нітросинього тетразолієвого тесту (НСТ) [6]. Статистичну обробку даних здійснювали з використанням програми «Statistika 6.0».

Результати та обговорення

Електронно-мікроскопічне дослідження проводилося з метою виявлення характеру активації чи ушкодження нейтрофільних гранулоцитів, викликаного активацією каскаду імунопатологічних механізмів у відповідь на довготривале антигенне навантаження, та оцінки ступеня морфологічних змін цих клітин на тлі введення К.

Електронно-мікроскопічне дослідження здійснювали одномоментно з вивченням нейтрофілозалежних механізмів фагоцитозу, що дозволило провести паралель між ступенем змін та активацією клітин.

В інтактних тварин сегментоядерний нейтрофіл перебуває в неактивованому стані. Ядро — типової мультилобарної конфігурації з гетерохроматином, розташованим по периферії нуклеоплазми, та еухроматином, локалізованим у центральних зонах. У цитоплазмі визначаються кілька специфічних гранул та більш електронно-щільних азурофільних гранул (лізосом). У ділянці, що прилягає до ядерної мембрани, — фаголізосома з наявними фагоцитованими фрагментами в порожнині. Про неактивний стан свідчить практично повна відсутність лізосом у цитоплазматичному матриксі.

На електроннограмі клітин, виділених у групі тварин зі змодельованим хронічним імунокомплексним процесом (ХІКП), НФ перебувають в активованому стані. Ділянки еухроматину значно більші за об'ємом порівняно із клітинами, виділеними в контрольній групі тварин. У цитоплазмі визначається велика кількість електронно-щільних азурофільних гранул (лізосом), поодинокі специфічні гранули, а також множинні фаголізосоми з наявністю фагоцитованих фрагментів у порожнині.

НФ, зустрівшись з агентами, що змушують клітину змінювати свій фізіологічний стереотип, відразу активуються. Піддаючись активації, нейтрофіл не лише перетворюється на могутній інструмент знешкодження шкідливих агентів, а й стає небезпечним і для нормальних тканин [1, 5, 7, 8, 11, 15, 18]. Під час стимуляції НФ активуються оксидази плазматичної мембрани, котрі запускають серію метаболічних реакцій, що характеризуються як «респіраторний вибух». Цей термін відображає швидку зміну метаболізму НФ з активацією внутрішньоклітинної мієлопероксидази й генерацією активних форм кисню. Володіючи вираженою бактерицидною дією, активні форми кисню виконують захисну функцію [7, 9, 14, 17].

Вивчення особливостей розвитку ХІКП показало, що в цих умовах зростає загальна кількість лейкоцитів ($(18,93 \pm 0,32) \times 10^9$ /л за норми — $(12,36 \pm 0,46) \times 10^9$ /л) і серед них НФ ($(3,83 \pm 0,10) \times 10^9$ /л за норми — $(2,72 \pm 0,10) \times 10^9$ /л). Кількість фагоцитних клітин достовірно збільшилася через 120 хв ($(85,10 \pm 1,63) \%$ ($p < 0,05$)), хоча швидкість фагоцитозу зменшилась ($(0,99 \pm 0,04) \%$ ($p < 0,005$)). Це свідчить про те, що НФ перші реагують на вторгнення чужорідних агентів, щоб знищити їх, а також сприяють переведенню цих антигенів в імуногенну форму [7, 14, 15, 18]. Зниження захоплювальної здатності, що супроводжується значним збільшенням усіх показників ЦК, указує на послаблення першої ланки імунологічного нагляду, що сприяє хронізації процесу.

Під час дослідження ферментативних процесів у нейтрофільних гранулоцитах виявлено збільшення показників МПТ ($(2,76 \pm 0,19) \times 10^9$ /л ($p < 0,002$)), що свідчить про активацію киснево-залежних ферментативних процесів. Метаболічна перебудова стимульованих НФ відбувається миттєво — «респіраторний вибух». В її основі лежать кисневозалежні реакції, у результаті яких утворюються активні форми кисню: супероксидний аніон, синглетний кисень, гідроксильний радикал, гіпохлорид. У ланцюгових метаболічних перетвореннях задіяна мієлопероксидаза — фермент азурофільних гранул [1, 2, 11, 18].

Показники ЛКТ вірогідно зросли як у відносних ($(82,64 \pm 3,53) \%$ ($p < 0,001$), так і в абсолютних значеннях ($(3,19 \pm 0,15) \times 10^9$ /л ($p < 0,001$)). Також збільшилася активність усередині одного нейтрофіла ($1,39 \pm 0,08$ ($p < 0,001$)). Показники окисно-відновної здатності лізосом НФ зросли у відсотках ($(16,50 \pm 0,80) \%$ ($p < 0,001$) та в абсолютних значеннях ($(0,64 \pm 0,04) \times 10^9$ /л ($p < 0,005$)), а резервна можливість — в абсолютних значеннях ($(0,71 \pm 0,04) \times 10^9$ /л ($p < 0,05$)).

Під час вивчення опосередкованих механізмів фагоцитозу за умов ХІКП усі показники ЦІК зросли порівняно з контрольною групою тварин. Підвищилася також активність системи комплементу ($60,46 \pm 2,65$ гемол. од. CH_{50}) проти контрольних показників ($70,96 \pm 3,14$ гемол. од. CH_{50}). В умовах довготривалої імунної відповіді ЦІК поповнюються новими антитілами, що створює умови для фіксації та руйнівної активації всього каскаду системи комплементу [2, 7, 18]. Підвищений рівень ЦІК у сироватці крові — характерна ознака ХІКП через постійну персистенцію антигену в крові.

Ми встановили, що в умовах досліджується зростає рівень ЦІК, які активують Fc- та C3b-рецептори на НФ, посилюючи ферментативні процеси в цих клітинах. Активація Fc- і особливо C3b-рецепторів НФ призводить до активації лізосомальних ферментів, котрі своєю чергою можуть розщеплювати компонент комплементу C3. Це зумовлює генерацію C3b, що забезпечує зчеплення НФ з ЦІК. Водночас вивільняються лізосомальні ферменти, фібриноген, ендотелін, колаген, що спричиняє розвиток запального процесу в судинній стінці [2, 7, 10, 17]. Ці явища підтверджуються нашими морфологічними дослідженнями (у цитоплазмі спостерігається велика кількість електронно-щільних азурофільних гранул, поодинокі специфічні гранули, множинні фаголізосоми з фагоцитованими фрагментами в порожнині, ділянки еухроматину в ядрі значно більші за об'ємом, ніж в інтактних тварин).

Вивчення особливостей розвитку ХІКП після введення К показало, що під його впливом відбулося достовірне зменшення загальної кількості лейкоцитів ($(16,07 \pm 0,35) \times 10^9$ /л) порівняно з

ХІКП, а також зменшення абсолютних значень НФ ($(3,44 \pm 0,06) \times 10^9$ /л).

К відновлює захоплювальну здатність НФ, про що свідчать показники ЛТ ($(90,40 \pm 1,98) \%$ ($p < 0,05$)), також кількість захоплених частинок латексу одним НФ ($4,46 \pm 0,16$ ($p < 0,05$)).

Ферментативні процеси в НФ під впливом К також зазнали певних змін, що виявилось у зменшенні активності як кисневозалежних ферментативних процесів ($(1,98 \pm 0,12) \times 10^9$ /л ($p < 0,001$)), так і окисно-відновних процесів у НФ ($(0,52 \pm 0,03) \times 10^9$ /л ($p < 0,005$)). Ці препарати стабілізують також кисневонезалежні механізми фагоцитозу, про що свідчать показники ЛКТ ($(2,24 \pm 0,09) \times 10^9$ /л).

На електроннограмі клітин, виділених у групі тварин зі змодельованим ХІКП, що отримували розчин К, НФ перебувають в активованому стані. Ділянки еухроматину менші за об'ємом порівняно із клітинами, виділеними у тварин дослідної групи. У цитоплазмі визначається менша кількість електронно-щільних азурофільних гранул (лізосом), виявляються поодинокі специфічні гранули, а також поодинокі фаголізосоми із наявністю фагоцитованих фрагментів у порожнині. Нейтрофільні гранулоцити з менш вираженими виявами активності.

Основні зміни свідчать про активацію НФ в умовах ХІКП, що підтверджує наші дослідження кисневозалежної та кисневонезалежної ферментативної активності фагоцитів і коригувального впливу К на ферментативні процеси в НФ у тварин із ХІКП, що запобігає руйнівним процесам, котрі виникають при перезбудженні НФ.

Висновки

Встановлено, що в умовах хронічного імунно-комплексного процесу активуються ферментативні процеси в нейтрофільних гранулоцитах. При застосуванні кверцетину морфологічні та ферментативні вияви активації стають менш вираженими. Отже, кверцетин здійснює стабілізаційний вплив на продукцію циркуляційних імунних комплексів, позитивно впливає на ферментативні процеси в нейтрофілах та захоплення чужорідних частинок.

Література

1. Варианты трансформации фенотипа нейтрофильных гранулоцитов $CD64^+CD32^+CD11b^+$ у новорожденных с различными инфекционно-воспалительными заболеваниями / И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова, Е.И. Клещенко и др. // Цитокины и воспаление. — 2011. — Т. 10, № 4. — С. 61—65.

2. Гомоляко І.В., Смирнова Л.М., Самсонова Г.В. Зміни в системі нейтрофільних гранулоцитів протягом регіонарної аналгезії // Патологія. — 2008. — Т. 5, № 3. — С. 23—25.
3. Гомоляко І.В., Тумасова К.П., Ключкова Н.Є. Нейтрофільні гранулоцити крові в нормі та при патології (цитологічне дослідження) // Лаб. діагностика. — 2006. — № 4. — С. 50—55.

4. Двойственная роль нейтрофильных гранулоцитов в реализации противоопухолевой защиты / Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А. и др. // Иммунология. — 2012. — № 5. — С. 281—287.
5. Дифференцированные влияния стимуляции *in vitro* на фенотип и функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов в норме и при осложненном острым деструктивным панкреатите / Нестерова И.В., Фомичева Е.В., Ковалева С.В. и др. // Иммунология. — 2009. — № 5. — С. 283—286.
6. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля, пер с нем. А.П. Тарасова. — М.: Медицина, 1987. — 472 с.
7. Коваль С.Б., Луніна Н.В., Середенко М.М. Синдром дегрануляції нейтрофілних лейкоцитів // Буковинський мед. вісник. — 1998. — Т. 2, № 4. — С. 204—213.
8. Медведев А.Н., Чаленко В.В. Способ исследования поглотительной фазы фагоцитоза // Лаб. дело. — 1991. — № 3. — С. 19—20.
9. Особенности ремоделирования фенотипа и функциональных возможностей нейтрофильных гранулоцитов пациентов с колоректальным раком под влиянием G-CSF в системе *in vitro* / Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А. и др. // Иммунология. — 2012. — № 6. — С. 306—311.
10. Особенности трансформации фенотипа субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD64 CD32+CD16+ CD11b+ и CD64+CD32+CD16+CD11b+ пациентов с колоректальным раком под влиянием Г-КСФ, ИФНа и ИФНу в системе *in vitro* / Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А. и др. // Аллергология и иммунология. — 2011. — № 3. — С. 10.
11. Особливості обміну оксиду азоту за умов хронічного гіперімунотоксичного синдрому та при застосуванні кверцетину в експерименті / В.В. Чоп'як, Г.О. Потьомкіна, І.В. Вальчук та ін. // Імунологія та алергологія. — 2008. — № 3 (додаток). — С. 9—13.
12. Петрова И.В., Васильева Л.Л. Метод выделения из периферической крови человека чистой популяции нейтрофилов для изучения их розеткообразующих свойств // Лаб. дело — 1983. — № 11. — С. 26—28.
13. Сапрыкин В.П. Морфологические варианты нейтрофильных гранулоцитов крови практически здоровых людей // Морфология. — 2001. — Т. 120, № 6. — С. 37—41.
14. Activation of human neutrophils by soluble immune complex: role of Fc-gamma R II and Fc-gamma R IIIb in stimulation of the respiratory burst and elevation of intracellular Ca²⁺ / C.G., Edwards, F.Watson, L.Gasmi et al. // Annals of the New-York Academy of Sciences. — 1997. — Vol. 832. — P. 341—357.
15. Barnes Peter J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease // J. Clin. Invest. — 2008. — Vol. 18, N 11. — P. 3546—3556.
16. Basu N., Watts R., Bajema I. et al. EULAR points to consider in the development of classification and diagnostic criteria in systemic vasculitis // Ann. Rheum. Dis. — 2010. — Vol. 69, N 10. — P. 1744—1750.
17. Neutrophil functional responses depend on immune complex valency / G.R. Strohmeier, B.A. Brunkhorst, K.F. Seetoo et al. // Journal of Leukocyte Biology. — 1995. — Vol. 58, N 4. — P. 403—414.
18. Pagnoux C., Hogan S.L., Chin H. et al. Predictors of treatment resistance and relapse in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated small-vessel vasculitis: comparison of two independent cohorts // Arthritis Rheum. — 2008. — Vol. 58, N. 9. — P. 2908—2918.
19. Sharma P., Sharma S., Baltaro R., Hurley J. Systemic Vasculitis // Am. Fam. Physician. — 2011. — Vol. 83, N 5. — P. 556—565.

Г.П. Никитюк, И.М. Лукович, Б.М. Верега

Электронно-микроскопические исследования и показатели ферментативных процессов нейтрофилов в условиях длительной антигенной нагрузки и на фоне введения кверцетина

Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого

Цель работы — изучить морфологические и ферментативные изменения в нейтрофильных гранулоцитах в условиях хронического иммунокомплексного процесса и при введении кверцетина.

Материалы и методы. Приведены результаты, полученные в двух группах животных (крыс): первая — с хроническим иммунокомплексным процессом, вторая — с хроническим иммунокомплексным процессом и введением раствора кверцетина. Для воспроизведения модели хронической сывороточной болезни выбрали модель, предложенную С.Г. Cochrane, в модификации С.В. Wilson и соавт. Кверцетин вводили по 4 мг/100 г внутривентриально 1 раз в сутки, курсом 10 дней. Нейтрофилы выделяли из крови методом центрифугирования на градиенте плотности фикал-верографина по методу И.В. Петровой. Захватывающую функцию нейтрофилов изучали с помощью латексного теста, ферментативную способность — с помощью миелопероксидазного теста, лизосомально-катионного теста и нитросинего тетразолиевого теста.

Результаты и обсуждение. Установлено, что в условиях хронического иммунокомплексного процесса активируются ферментативные процессы в нейтрофильных гранулоцитах. При применении кверцетина морфологические и ферментативные проявления активации становятся менее выраженными.

Выводы. Кверцетин имеет стабилизирующее влияние на продукцию циркуляционных иммунных комплексов, положительно влияет на ферментативные процессы в нейтрофилах и захват чужеродных частиц.

Ключевые слова: нейтрофилы, хронический иммунокомплексный процесс, кверцетин, электронная микроскопия.

H.P. Nykytiuk, I.M. Lukovych, B.M. Verveha

Electron-microscopic investigation and indices of the enzymatic processes in neutrophils in conditions of long lasting load against the background of quercetine injection

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ukraine

Objective. To study the morphological and enzymatic changes in neutrophilic granulocytes under the conditions of the chronic immune complex process and quercetine injection.

Materials and methods. The results have been presented, obtained in experiments with two groups of animals (rats): the first was with chronic immune complex process, and the second chronic immune complex process and quercetine injection. To simulate the chronic serum diseases a model was chosen proposed by Cochrane C.G. modifying the Wilson C.B. et al. Quercetin was administered in a dose of 4 mg/100 g intra-abdominal 1 time a day during 10 days. Neutrophils were extracted from the blood by density gradient centrifugation on fikol-verohrafini with method of Petrova I.V. The holding neutrophils' function was studied using a latex test, enzymatic resolution using myeloperoxidase test, lysosomal cationic test and tetrazolium blue test.

Results and discussion. It has been established that in the conditions of chronic immune complex the enzymatic process in neutrophilic granulocytes were activated. Administration of quercetine resulted in the less manifested morphological and enzymatic activation.

Conclusions. Quercetine has a stabilizing effect on the production of the circulatory immune complexes, it positively effects on the enzymatic processes in the NPH and capture of foreign particles.

Key words: neutrophils, chronic immune complex process, quercetine, electron microscopy.