

Участь нейтрофільних механізмів у патогенезі хронічної гіперімунокомплексмії

Для воспроизведения модели хронической гипериммунокомплексмии (ХГИК) использовали классическую разработку Cochrane. Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) определяли преципитационным методом, а фиксированные — иммунофлуоресцентным в отпечатках эндотелия аорты и клиренсных органах — печени и селезенке. Оценку нейтрофильного статуса проводили по розетко-образующей способности нейтрофилов, латексным, зимозановым, миелопероксидазным, НСТ-тестам. Установлено увеличение числа больших и средних ЦИК в сосудистом русле, фиксацию их в бифуркации аорты, а также на клетках печени и селезенки, где интенсивность накопления их меньше по сравнению с эндотелием аорты. Нейтрофильный статус характеризовался увеличением О-нейтрофилов, усилением захватывающей функции макрофагов, значительной активацией ферментативных систем полинуклеаров, хотя резервные возможности в них возросли меньше. Морфологические исследования позволяют опосредованно судить об участии нейтрофилов в повреждении эндотелиоцитов и способности их обеспечивать дальнейшее участие мононуклеарных клеток в повреждении стенок аорты, а также частично печени и селезенки.

Вступ

В останнє десятиріччя поглиблено вивчається участь нейтрофільних механізмів за умов хронічних запальних процесів у судинній стінці [7, 10, 13, 15, 20]. Значна увага приділяється ролі імунних комплексів і полінуклеарів у пошкодженні ендотелію судин, клітинно-гладком'язових трансформацій, ремодуляційних процесів у пластах судинної стінки [5, 12]. Встановлено, що під впливом імунних комплексів нейтрофіли викликають вихід цитокінів з імунокомпетентних клітин, зумовлюючи ендотеліальну експресію адгезивних молекул, що в свою чергу призводить до подальшої акумуляції біля ендотелію нейтрофілів, тромбоцитів [14].

Мета нашого дослідження — вивчити участь нейтрофільних клітин у розвитку хронічної гіперімунокомплексмії на основі їх імуноадгезивних, фагоцитарних, ферментативних властивостей.

Методика

Для відтворення моделі хронічної сироваткової хвороби (ХСХ) використовували класичні варіанти [8, 11]. Дослідження проведені на 50

статево зрілих щурах-самцях масою 180 — 200 г. Тваринам дослідної групи вводили в хвостову вену бичачий сироватковий альбумін з розрахунку 100 мг/кг (0,5 мл 2 %-го розчину) кожні 7 діб упродовж 12 тиж. Визначення числа циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) проводилось з виключенням хибнопозитивних факторів (кріопротейнів, кріофібриногену) зі збереженням температурного режиму та часу їх визначення [16] і використанням різних концентрацій поліетиленгліколю (ПЕГ) (М 6000), що дозволило нам характеризувати присутність у судинному русі великих, середніх і малих ЦІК. Дослідження фіксованих імунних комплексів проводили імуофлуоресцентно у відбитках ендотелію аорти в місцях найбільшого гемодинамічного навантаження (біфуркація аорти), а також у кліренсних органах ЦІК — печінці, селезінці [2, 9]. Для оцінки нейтрофільного статусу використано наступні методики: 1) загальне та комплементарне розеткоутворення нейтрофілів (Е — РУН та ЕАС — РУН) з вирахуваннями О-нейтрофілів [4], що дозволило оцінити рецепторний апарат нейтрофільних мембран, а саме Fc- та C3b-рецептори; 2) латексний тест (ЛТ) фагоцитарної активності нейтрофілів [3, 6], який дає можливості виявити неспецифічну захоплюючу здатність полінуклеарів; 3) зимозановий тест (ЗТ) лектинозалежної активації нейтрофілів з виключенням C8b-рецепторів [3]; 4) мієлопероксидазний тест (МПТ), який вказує на кисневозалежні ферментативні процеси в лізосомах нейтрофілів [18]; 5) нітросиній тетразолієвий тест (НСТ) спонтанний і стимульований (агрегованим IgG) [1, 19], який дозволяє оцінити окисно-відновну здатність лізосомального апарату мікрофагів, а також його резервну можливість; 6) матеріал для морфологічного дослідження забирали при проведенні автопсій тварин, фіксували 10 %-м розчином нейтрального формаліну, гістологічні препарати забарвлювали гематоксилін-еозином.

Статистичні результати обробляли на комп'ютері IBM-386 за Стюдентом, Фішером.

Результати та їх обговорення

Проведено аналіз нейтрофільного статусу крові 20 інтактних і 30 дослідних тварин за умов хронічної гіперімунотоксичності (ХГІК). У тварин дослідної групи з модельованою ХСХ встановлено вірогідне збільшення в сироватці крові концентрації великих і частково середніх ЦІК порівняно з контрольною групою. Результати цих досліджень наведено в табл. 1. Дрібні ЦІК мали лише тенденцію до підвищення концентрації. Аналіз імуофлуоресцентних досліджень, дозволив нам оцінити ступінь фіксації імунних комплексів на клітинах-мішенях і кліренсних органах і виявив наступні закономірності. Сумарні антитіла (γ -глобулінова фракція) виявляються на ендотелії аорти інтенсивністю у 26,8 %, виражена ступінь фіксації встановлена у 61,9 %, а середня — у 9,5 % випадків. Імуофлуоресцентні дослідження печінки та селезінки вказують на відкладення мічених антитіл на клітинах цих органів, особливо в тканинах печінки (рис.1). Так їх виражена фіксація

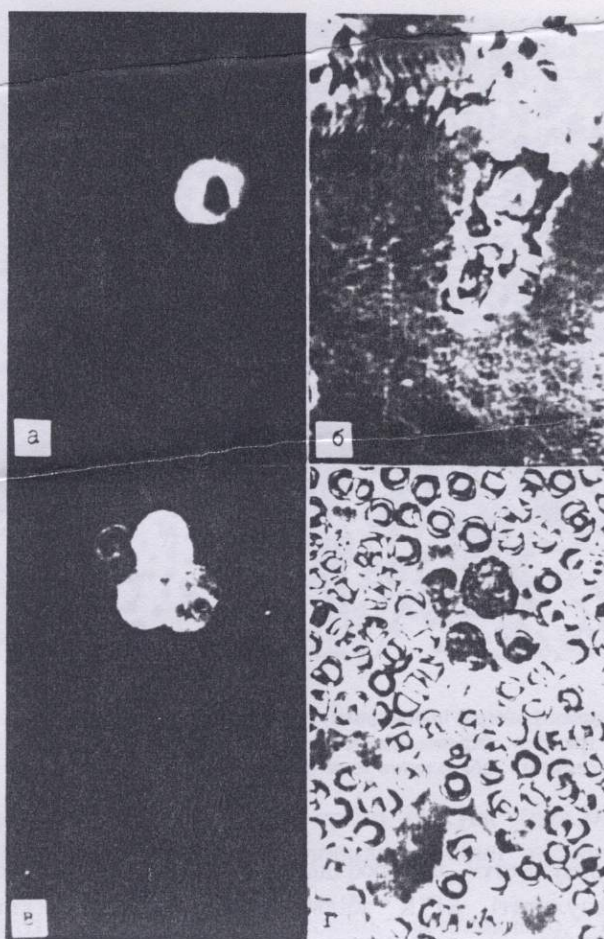


Рис. 1. Інтенсивне свічення клітин у відбитку ендотелію аорти за умов хронічної гіперімунокомплексемії. Метод флуоресціюючих антитіл (а). Той же препарат при фазовоконтрастній мікроскопії Об. $\times 90$, гомаль $\times 5$ (б). Різна інтенсивність флуоресценції (від слабкої до значно інтенсивної) клітин печінки за умов хронічної гіперімунокомплексемії. Метод флуоресціюючих антитіл (а). Той же препарат при фазовоконтрастній мікроскопії. Об. $\times 90$, гомаль $\times 5$ (б)

в печінці становила 42,8 %, середня — 52,4 % випадків, в селезінці виражена — 12,2 %, середня — 24,6 %, слабка — 42,8 % випадків.

Зміни імунокомплексного гомеостазу за умов ХГІК характеризувалися певними особливостями нейтрофілзалежних механізмів. У табл. 2

Т а б л и ц я 1. Особливості імунокомплексемії за умов хронічної сироваткової хвороби у щурів ($M \pm m$)

Показник	Інтактні тварини (n = 20)	Дослідні тварини (n = 30)
Циркуючі імунні комплекси		
великі	$70,5 \pm 3,7$	$165,3 \pm 42,1^*$
середні	$102,0 \pm 3,9$	$189,3 \pm 16,0^{**}$
малі	$164,5 \pm 6,2$	$205,8 \pm 65,8$

* $P < 0,001$, ** $P < 0,005$.

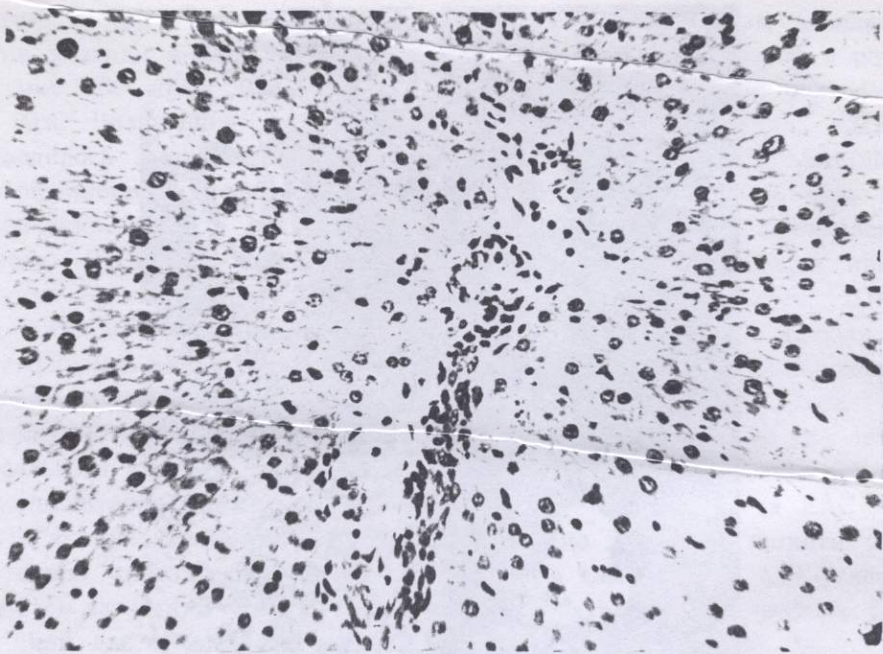


Рис.2. Дифузійні мононуклеарні інфільтрати (лімфоцитарно-макрофагальні по ходу синусоїдів та портальних трактів, окремі фокуси склерозу в печінці тварин з хронічною гіперімунокомплексемією). Забарвлення гематоксилін-еозином. 36. 70

представлені результати нейтрофільного статусу інтактних і дослідних тварин. У результаті ХГІК збільшується абсолютна кількість нейтрофілів, частково — кількість Fc-розеткоутворюючих нейтрофілів ($P < 0,01$), а особливо C3b-розеткоутворюючих нейтрофілів ($P < 0,01$). Незважаючи на це, збільшилося відносне і абсолютне число слабко-рецепторних О-нейтрофілів. Фагоцитарна функція мікрофагів, а саме захоплюючи їх спроможність підвищилася у відносному і абсолютному відношенні, що підтверджується латексним тестом. Активізувалися лектинзалежні механізми фагоцитозу, що вказує на збільшення інтенсивності зимозанового тесту.

Виявлено певні особливості лізосомальних ферментативних систем у нейтрофілах. Так, значно посилюються кисневозалежні мієлопероксидазні процеси. Меншою мірою підвищилася спонтанна активність окисно-відновних ферментів при виснаженні резервної спроможності їх функцій. Це підтверджується стимульованим НСТ-тестом, в якому число диформастанчутливих нейтрофілів після стимуляції латексом вірогідно не змінювалося.

Морфологічні дослідження біфуркації аорти показали значне скупчення полінуклеарів і тромбоцитів біля ендотеліоцитів з частковою деструкцією останніх. У стінці аорти спостерігалось накопичення поодиноких плазматичних клітин і мононуклеарів. Мало місць збільшення об'єму окремих ендотеліоцитів. У печінці дослідних тварин встановлено помірно виражену дифузну інфільтрацію мононуклеарами в синусах по

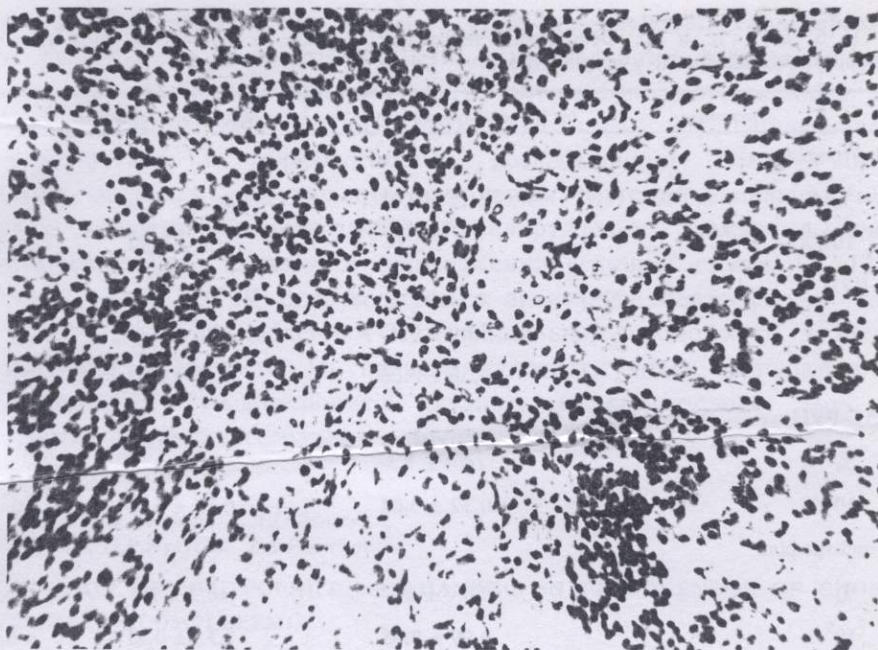


Рис.3. Гіпоплазія білої пульпи, фіброз, гістіоцитоз у селезінці тварин з хронічною гіперімунокомплексемією. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. 70

ходу порталних трактів і окремі дрібні фокуси (рис.2). У селезінці цих тварин відмічений фіброз і гіпоплазія білої пульпи, гістіоцитоз (рис.3).

У результаті проведених досліджень встановлено, що за умов хронічної гіперімунокомплексемії підвищується рівень великих і середніх ЦІК, які активізують Fc- і C3b-рецептори на нейтрофілах, посилюють киснево-залежні та окисно-відновні ферментні процеси в полінуклеарах. Водночас потенційна спроможність імуноадгезивних властивостей нейтрофілів зменшується у зв'язку зі збільшенням кількості О-нейтрофілів. Окрім того, виснажується резервний потенціал окисно-відновних процесів у лізосомах нейтрофілів. Пролонгована активація цих механізмів призводить до включення мононуклеарних процесів у розвиток хронічного запалення, а також є хорошим субстратом для ланцюгового утворення антинейтрофільних антитіл. Виявлення потенціального дефіциту полінуклеарних механізмів є сприятливим фоном для хронічної персистенції особливо великих ЦІК і їх відкладення на ендотелії аорти в місцях найбільшого гемодинамічного навантаження. Це підтвердили імунофлуоресцентними дослідженнями біфуркації аорти. Одночасно хронічна персистенція ЦІК, особливо середніх, на фоні даного нейтрофільного статусу зумовила структуральні зміни в кліренсних органах: печінки та селезінки, що може підтримувати подальшу гіперімунокомплексемію.

Включення через Fc- і особливо C3b-рецептори активації нейтрофілів ЦІК спричинює індукцію, залежно від дози та часу їх персистенції, збільшення лізосомальних ферментів, які в свою чергу мо-

Т а б л и ц я 2. Особливості нейтрофілзалежних механізмів за умов хронічної гіперімунокомплексемії у щурів ($M \pm m$)

Показник	Інтактні тварини (n = 20)	Дослідні тварини (n = 30)	P
Нейтрофіли			
%	$21,7 \pm 2,03$	$20,4 \pm 1,24$	
$10^9/\text{л}$	$2,0 \pm 0,34$	$4,9 \pm 0,39$	$< 0,001$
Е-РУН			
%	$39,6 \pm 0,93$	$34,3 \pm 0,66$	
$10^9/\text{л}$	$0,69 \pm 0,06$	$1,52 \pm 0,21$	$< 0,01$
ЕАС-РУН			
%	$14,4 \pm 1,5$	$19,4 \pm 0,68$	
$10^9/\text{л}$	$0,32 \pm 0,03$	$0,85 \pm 0,09$	$< 0,001$
О-нейтрофіли			
%	$56,0 \pm 3,1$	$46,2 \pm 2,3$	$< 0,05$
$10^9/\text{л}$	$0,99 \pm 0,08$	$2,53 \pm 0,21$	$< 0,01$
Латексний тест			
%	$38,3 \pm 2,8$	$52,3 \pm 2,9$	$< 0,05$
$10^9/\text{л}$	$0,42 \pm 0,05$	$3,1 \pm 0,52$	$< 0,01$
Зимозановий тест			
%	$14,1 \pm 0,62$	$21,7 \pm 0,71$	
$10^9/\text{л}$	$0,42 \pm 0,05$	$1,08 \pm 0,11$	$< 0,01$
Мієлопероксидазний тест			
%	$72,3 \pm 1,5$	$88,9 \pm 2,05$	
$10^9/\text{л}$	$2,0 \pm 0,23$	$4,4 \pm 0,41$	$< 0,01$
Нітросиній тетразолієвий тест			
спонтанний			
%	$11,0 \pm 0,73$	$10,11 \pm 0,73$	
$10^9/\text{л}$	$0,34 \pm 0,05$	$0,91 \pm 0,1$	$< 0,05$
стимульований			
%	$25,9 \pm 1,72$	$31,3 \pm 0,71$	
$10^9/\text{л}$	$0,45 \pm 0,06$	$1,55 \pm 0,14$	

жуть розщеплювати компонент С3, генеруючи ще в більшій кількості С3b, і забезпечуючи цим процесом посилення зчеплення нейтрофілів з ЦІК. Ці компоненти комплементу є агентами-мостиками між полінуклеарними рецепторами та антитілами (АТ) [16]. Такі утворення взаємодіють з ендотеліоцитами, самі руйнуються і, активізуючи ендотеліоцит, вивільнюють лізосомальні ферменти, фібриноген, ендотелін, колаген, ІЛ-1, ІЛ-8, α TNF тощо. Це призводить до розвитку запаль-

них процесів у стінці судини, а в крові до активації безпосередньо фактора Хагемана, спричиненого ЦІК, лізосомальними ферментами, колагеном з активацією систем коагуляції, фібринолізу, кінінів, які підтримуються тромбоцитарним фактором-3 [3, 17]. Вищезгадане підтверджується і морфологічними дослідженнями стінки аорти, печінки, селезінки, які свідчать про явища системно запальних процесів з явищами гіперкоагуляційного напруження і лежать в основі імунотоксичного запального пошкодження судинної стінки [2, 12].

Таким чином, ХГІК супроводжується активацією нейтрофільної ланки фагоцитозу з послабленням її потенціальної спроможності до окисно-відновної активності. Ці процеси супроводжуються пошкодженням клітин-мішеней (ендотеліоцитів судин) і структурних змін у кліренсних органах, особливо у печінці.

*M.M.Bidiuk, V.V.Chopyak, L.A.Liubinetz,
S.I.Pavlovich, G.P.Nykytiuk, Z.S.Porochovska*

PARTICIPATION OF NEUTROPHILIC MECHANISMS IN PATHOGENESIS OF CHRONIC HYPERIMMUNOCOMPLEXEMIA

For reproduction of chronic hyperimmunocomplexemia model the classic Cochrane C.G., 1973 elaboration was used. The circulative immune complexes (CIC) were identified by precipitative methods, and fixated — by immunofluorescent in endothelium reproduction of aorta, and their clearance organs — liver and spleen. The estimation of neutrophile status was carried out according to rosette-forming neutrophiles ability — by latex, zimosane, mieloperoxidase, NST tests. The growth of large and middle CIC in vessel bed was estimated, their fixation in aorta bifurcation, and also on liver and spleen calls, but their intensity is less, comparing to aorta endothelium. The neutrophile status was characterised by O-neutrophiles growth, strengthening of capturing macrophages function, considerable activation of fermentative polynuclears systems, although reserve possibilities in them grew in less degree. Morphologic investigations allow to speak mediately about neutrophils participation in endotheliocytes damage, and also about their ability to secure the mononuclear cells further participation in damaging of aorta walls and partially of liver and spleen.

Medical university,
Lviv, Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Адаменко Г.П. Взаимодействие поли- и мононуклеарных фагоцитов крови человека и механизм модуляции уровня экспрессии и свойств рецепторов к Fc-фрагменту иммуноглобулина на нейтрофильных лейкоцитах, культивируемых с моноцитами в смешанной культуре клеток // Иммунология. — 1993. — № 1. — С. 21 — 23.
2. Максимович Н.А., Павлович С.И. Применение иммунофлуоресцентного метода в экспресс-диагностике дизентерии Зонне: Метод. рекомендации МЗ УССР. К., 1971. — 20 с.
3. Маянский А.Н., Чельшов И.В., Чеботарь И.В. Кондиционирование IgG- и C3a-зависимых реакций нейтрофилов в условиях специфической и неспецифической адгезии // Иммунология. — 1993. — № 1. — С. 23 — 25.

4. Петрова И.В. Розеткообразующая способность нейтрофилов: Метод. рекомендации. — М., 1982. — 28 с.
5. Ширшев С.В. Белки фетоплацентарного комплекса в регуляции иммунных реакций // Успехи совр. биологии. — 1993. — 113, Вып. 2. — С. 230 — 246.
6. Bongrand P., Bartolin R., Bonoeno G. et al. Effect of Age on SDifferent Receptors and Functions of Phagocytic Cell. // J. Clin. lab. Immunol. — 1984. — 15, N 1. — P. 45 — 50.
7. Bredveld F.C., Huuokens A.H., Lateber G.J. et al. Immune Complexes in Sera from Patients with Rheumatism Vasculitis Induce Polymorphonuclear Cell-Mediated Injury to Endothelial Cell // Clin. Immunol. and Immunopathol. — 1988. — 48, N 2. — P. 202 — 213.
8. Cochrone C.G., Koffler D. Immune complex disease in experimental animals and man // Adv. Immunol. — 1973. — 16. — P. 185 — 264.
9. Coons A.H., Kaplan M.H. Localization of antigen in tissue cells. II Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody // J. Exp. Med. — 1950. — 91, N 1. — P. 1.
10. Erb P. What is immunoregulation // Agent and Actions. — 1984. — 15, N 1-2. — P. 59—61.
11. Ertemeyer I.E. Serum sichness // Ann. allergy. — 1986. — 56, N 2. — P. 105 — 109.
12. Frampton G., Jayne D., Perry G. et al. Autoantibodies to endothelial cells and neutrophil cytoplasmic antigens in systemic vasculitis // Clin. and exp. Immunol. — 1990. — 82, N 2. — P. 227 — 237.
13. Gieldanowski J., Lemmel E.E. Studies of immunotropic activity of certain immunomodulators // Arch. Immunol. Ther. Exp. — 1987. — 35, N 2. — P. 155 — 159.
14. Grant A., Alam R. Immunomodulating agents and mechanism // In: Annals of Allergy — Angust (Part II), 1991. — 67, N 2. — P. 195 — 198.
15. Hadden J.W. Immunopharmacology. Immunomodulation and imunotherapy // Jamma. — 1987. — 258, — P. 3005 — 3010.
16. Haskova V., Kaslik J., Motejekava M. Novy zpusob stanoveni circulujujich imunokomplexy w lidskych sezech // Cas. lek. cesk. — 1977. — 116, N 14. — C. 436 — 437.
17. Lay K.N., Jayne D.R.W., Brownlef A., Lochubod C.M. The specificity of anti-neutrophil cytoplaic autoantibodies vasculitides. // Clin. and exp. Immunol. — 1990. — 82, N 2. — P. 233 — 237.
18. Lee S.S., Thomson R.A. Anti-myeloperoxidase antibodies in systemic vasculitis // Ibid. — 1990. — 79, — P. 41 — 46.
19. Park H.B. Infection and Nitroblue tetrasolium Reduction by Neutrophile // Lancet. — 1968. — 11, N 7. — P. 532 — 534.
20. Wilson C.W., Dixon F.J. Rena response to immunological injury. — In: The Kidney / Ed. B.B. Brenner. Philadelphia, 1976. — P. 838 — 940.

Львів. мед. ун-т,
М-во охорони здоров'я

Матеріал надійшов
до редакції 3.12.96