

Н.В.Кучкина, М.В.Самсонова

ВЛИЯНИЕ ОСМОТИЧНОСТИ СРЕДЫ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ПРИ МУКОВИСЦИДОЗЕ

НИИ пульмонологии МЗ РФ, Москва

INFLUENCE OF MEDIUM OSMOLALITY ON MORPHOFUNCTIONAL STATE OF BLOOD NEUTROPHILES IN CYSTIC FIBROSIS

N.V.Kuchkina, M.V.Samsonova

S u m m a r y

The effects of different osmolality levels on functional activity and morphometrical parameters of blood neutrophiles in cystic fibrosis were observed in this study. Functional activity of neutrophiles was estimated on the basis of their ability to produce reactive oxygen species (ROS) (respiratory burst reaction).

There were found some nonsignificant morphometrical changes of neutrophiles under isoosmotic condition, hypoosmotic swelling and hyperosmotic shrinking. Modification of functional neutrophile activity to form the respiratory burst reaction and dependency of this reaction on osmolality were not revealed.

Р е з ю м е

Проведено исследование влияния различной осмотичности среды на функциональную активность нейтрофилов крови при муковисцидозе, определяемую по их способности к образованию высокореактивных метаболитов кислорода (реакция "кислородного взрыва"), а также на морфометрические показатели этих клеток.

Показано, что несмотря на изменения некоторых морфометрических характеристик нейтрофилов при муковисцидозе в условиях изоосмоса, а также в условиях гипоосмотического набухания или гиперосмотического сжатия, модификации функциональной способности клеток к формированию реакции "кислородного взрыва", а также осмотической зависимости этой реакции не выявлено.

Необходимым условием участия нейтрофилов в иммунной реакции является активация этих клеток, сопровождающаяся хемотаксисом, адгезией, дегрануляцией, фагоцитозом, а также перестройкой окислительного метаболизма. При этом наблюдается "кислородный взрыв", то есть резкое возрастание потребления клеткой кислорода и образование его высокореактивных метаболитов — супероксид-аниона ($O_2^{\cdot -}$), пероксида водорода (H_2O_2), гидроксильного радикала ($HO^{\cdot}$) и синглетного кислорода (1O_2) [2]. Образование активных форм кислорода играет главную роль в бактерицидном действии нейтрофилов, определяя тем самым их роль в воспалительных реакциях [10].

Имеющиеся в литературе данные указывают на то, что изменение объема клетки, происходящее при изменении осмотических условий среды, играет существенную роль в регуляции клеточных функций, в том числе пролиферации и программируемой смерти клеток, синтезе и метаболизме белков [6]. Исследование осмотической регуляции "кислородного взрыва" в нейтрофилах представляет собой интерес, поскольку в местах локализации этих клеток *in vivo* может происходить

изменение осмотичности внеклеточной среды, связанное с протеканием воспалительной реакции [4].

Единичные данные, имеющиеся в литературе [8,12], а также результаты наших исследований [5] свидетельствуют, что реакция "кислородного взрыва" нейтрофилов является осмотически регулируемой. В этой связи особый интерес представляет исследование осмотической зависимости функциональной активности нейтрофилов при муковисцидозе в силу того, что генетически обусловленное нарушение транспорта ионов хлора в эпителиальных клетках может обуславливать наиболее выраженное изменение осмотичности внеклеточной среды [11].

В настоящей работе исследовано влияние различной осмотичности среды на способность нейтрофилов крови больных муковисцидозом продуцировать высокореактивные кислородные метаболиты, а также проведена оценка морфометрических показателей этих клеток в условиях гипоосмотического набухания и гиперосмотического сжатия.

Исследование проводили на нейтрофилах периферической крови 6 взрослых больных муковисцидозом

и 6 лиц, не страдающих заболеваниями бронхолегочной системы (доноров). Для выделения клеток в качестве основы был выбран метод, предложенный *Вонг* [1], включающий седиментацию декстраном и градиентное центрифугирование на фиколл-паке (плотность 1,077 г/мл). Остаточные эритроциты удаляли изотоническим лизисом, используя 0,83 NH_4Cl . Клетки суспендировали в среде А (140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ CaCl_2 , 1 мМ MgCl_2 , 1 мМ Na_2HPO_4 , 5 мМ глюкозы, 10 мМ HEPES-трис, pH 7,4) до концентрации 2×10^7 клеток в 1 мл и хранили во льду. В полученной суспензии содержание нейтрофилов составляло около 97%, а их жизнеспособность, определенная в тесте с трипановым синим, — 99%.

Образование активных форм кислорода в ходе реакции “кислородного взрыва” регистрировали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) [9] с помощью хемилюминометра ПХЛ-01 (Москва, Россия). Реакцию проводили в 1 мл среды различной осмотичности (pH 7,4), содержащей люминол (10^{-4} М) и 2×10^5 нейтрофилов. Активацию “кислородного взрыва” индуцировали форбол-12-мирикат-13-ацетатом (ФМА; 10^{-8} М). Во всех случаях нейтрофилы (2×10^5 кл/мл) инкубировали при 37°C в течение 3 мин до внесения активатора.

Гипоосмотическую среду (200—300 мосМ) получали добавлением к среде А (320 мосМ) аналогичной среды, не содержащей NaCl, а гиперосмотическую (345—620 мосМ) — добавлением к среде А сахарозы. Значения осмотичности рассчитывали как для идеальных растворов.

Морфометрическое исследование нейтрофилов проводили с помощью компьютерной системы анализа изображения. В полуавтоматическом или интерактивном режиме проводили выделение клеток и их ядер с последующим измерением площади клетки, цитоплазмы и ядра. Необходимое для исследования количество клеток определяли в пробном эксперименте с учетом биологической вариабельности.

При анализе люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) нейтрофилов периферической крови было обнаружено, что максимальное значение ответа, индуцированного ФМА, у больных муковисцидозом составило 688 ± 87 отн.ед., что достоверно отличалось от значения, выявленного в контрольной группе доноров (489 ± 51 отн.ед.). Показатели спонтанной хемилюминесценции в исследуемой и контрольной группах также практически не отличались друг от друга ($9,0 \pm 3,9$ и $6,8 \pm 1,4$ отн.ед. соответственно). Хотя к настоящему времени исследования хемилюминесценции нейтрофилов крови, характеризующей способность этих клеток формировать реакцию “кислородного взрыва” в ответ на их стимуляцию, при муковисцидозе проведены рядом исследователей [3,7], результаты этих исследований противоречивы. Так, *Roberts, Stiehm* [7] указывают на повышение уровня хемилюминесценции в нейтрофилах больных муковисцидозом. В то же время данные *Graft et al.* [3] свидетельствуют о нормальном уровне хемилюминесценции в нейтрофилах при данной патологии. На наш взгляд, такие различия могут быть связаны с использованием авто-

рами в качестве индукторов “кислородного взрыва” соединений, различающихся между собой по природе и механизму действия. Данные, полученные нами, согласуются с результатами, представленными *Graft et al.* [3], однако необходимо отметить, что в группе больных муковисцидозом наблюдается тенденция к повышению интенсивности ФМА-индуцированной хемилюминесценции по сравнению с контрольной группой.

При изучении влияния различной осмотичности среды инкубации на формирование реакции “кислородного взрыва” в нейтрофилах было обнаружено, что увеличение осмотичности от 320 до 620 мосМ или ее снижение до 200 мосМ, приводящее, соответственно, к существенному уменьшению или увеличению объема этих клеток, оказывает модулирующее влияние на интенсивность хемилюминесценции. Как при гиперосмотическом сжатии, так и при гипоосмотическом набухании клеток наблюдается ярко выраженная дозовая зависимость ингибирования интенсивности хемилюминесценции, индуцированной ФМА, по сравнению с условиями изотонии (320 мосМ). Снижение осмотичности среды инкубации от 320 до 200 мосМ приводит к двукратному уменьшению интенсивности хемилюминесценции нейтрофилов крови больных муковисцидозом, а повышение осмотичности от 320 до 420 мосМ вызывает 70% ингибирование реакции (рисунок).

Анализ полученных данных свидетельствует, что дозовая зависимость и степень ингибирования интенсивности хемилюминесценции при повышении или снижении осмотичности среды инкубации клеток в группе больных муковисцидозом коррелирует с наблюдаемыми показателями в контрольной группе (см. рисунок).

При морфометрической оценке нейтрофилов крови было выявлено, что в условиях изотонии (320 мосМ) площадь всей клетки и площадь цитоплазмы у больных муковисцидозом достоверно меньше, чем в контрольной группе. Однако ядерно-цитоплазматическое отношение в нейтрофилах при муковисцидозе достоверно выше, чем в контроле (таблица). С нашей точки зрения, такие морфометрические изменения нейтро-

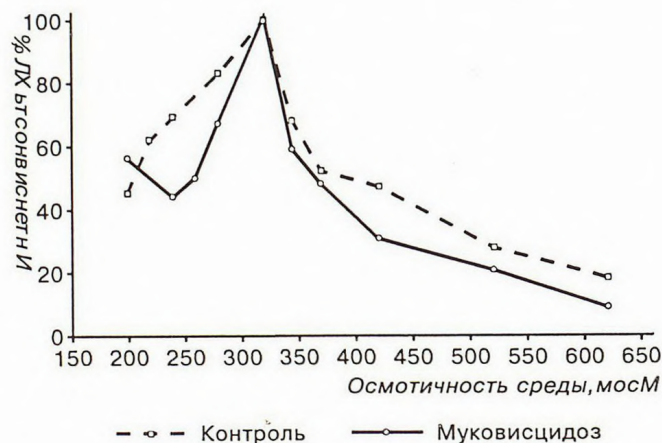


Рис. Влияние осмотичности среды на интенсивность ФМА-индуцированной ХЛ нейтрофилов крови (за 100% принята интенсивность ХЛ в изотонической — 320 мосМ — среде).

Морфометрия нейтрофилов крови в средах различной осмотичности

	Контроль	p	Муковисцидоз
Изоосмос (320 мосМ)			
Площадь клетки, мкм ²	48,18±1,37	<0,001	32,93±1,17
Площадь цитоплазмы, мкм ²	27,42±1,35	<0,001	15,71±0,99
Ядерно-цитоплазматическое отношение	0,83±0,06	<0,01	1,22±0,08
Гипоосмос (240 мосМ)			
Площадь клетки, мкм ²	59,21±3,25	<0,001	47,79±2,20
Площадь цитоплазмы, мкм ²	30,89±2,01	<0,01	23,42±1,31
Ядерно-цитоплазматическое отношение	0,98±0,05		1,11±0,07
Гиперосмос (520 мосМ)			
Площадь клетки, мкм ²	29,09±0,66	<0,01	26,20±1,12
Площадь цитоплазмы, мкм ²	13,91±0,07	<0,01	11,45±1,13
Ядерно-цитоплазматическое отношение	1,17±0,07		1,06±0,007

филов можно объяснить либо их ускоренным созреванием в кровяном русле в условиях хронического воспалительного процесса, либо наличием дополнительного выброса этих клеток из депо. Наблюдаемое увеличение показателя ядерно-цитоплазматического отношения свидетельствует в пользу того, что нейтрофилы крови больных муковисцидозом более зрелые и обладают достаточно высокой активностью. Это подтверждается данными, полученными нами при исследовании реакции "кислородного взрыва" методом хемилюминесценции.

При помещении клеток в условия различной осмотичности было показано, что площадь клетки и площадь цитоплазмы при муковисцидозе достоверно меньше, чем у доноров, как в гипоосмотической (240 мосМ), так и в гиперосмотической (520 мосМ) среде (см. табл.) При этом следует отметить, что гипоосмотическое набухание было более выражено в клетках при муковисцидозе: площадь клетки увеличивалась по сравнению с изоосмотическим состоянием на 45%, в контроле же наблюдали увеличение площади клетки лишь на 23%. Однако в гиперосмотической среде сжатие нейтрофилов было выше в группе контроля: площадь клетки уменьшалась на 40% по сравнению с

условиями изоосмоса, тогда как при муковисцидозе — приблизительно на 20%. При этом не выявлено отличий ядерно-цитоплазматического отношения в группе контроля и при муковисцидозе при помещении нейтрофилов в различные осмотические среды (см. табл.)

Таким образом, проведенное нами исследование показало, что изменение некоторых морфометрических характеристик нейтрофилов крови при муковисцидозе не оказывает влияния на способность этих клеток к формированию реакции "кислородного взрыва", определяющей их бактерицидное действие. При этом не выявлено нарушений в осмотической регуляции реакции "кислородного взрыва".

ЛИТЕРАТУРА

1. Bouym A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1xg // Scand. J. Clin. Lab. Invest.— 1968.— Suppl.97.— P.77—98.
2. Clark R.A. The human neutrophil respiratory burst oxidase // J. Infect. Dis.— 1990.— Vol.161.— P.1140—1147.
3. Graft D.F., Mischler E., Farrell P.M., Busse W.W. Granulocyte chemiluminescence in adolescent patients with cystic fibrosis // Am. Rev. Respir. Dis.— 1982.— Vol.125.— P.540—543.
4. Hoffmann E.K., Simonsen L.O. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells // Physiol. Rev.— 1989.— Vol.69.— P.315—382.
5. Kuchkina N.V., Orlov S.N., Pokudin N.I., Chuchalin A.G. Volume-dependent regulation of respiratory burst of activated human neutrophils // Experientia.— 1993.— Vol.49.— P.995—997.
6. Lang F., Ritter M., Volkl H., Haussinger D. The biological significance of cell volume // Renal Physiol. Biochem.— 1993.— Vol.16.— P.48—65.
7. Roberts R.L., Stiehm E.R. Increased phagocytic cell chemiluminescence in patients with cystic fibrosis // Am. J. Dis. Child.— 1989.— Vol.143.— P.944—950.
8. Sato N., Kashima K., Shimizu H., Uehara Y., Shimomura Y., Mori M. Hypertonic glucose inhibits the production of oxygen-derived free radicals by rat neutrophils // Life Sci.— 1993.— Vol.52.— P.1481—1486.
9. Takahashi R., Edashige K., Sato E.F., Inoue M., Matsuno T., Utsumi K. Luminol chemiluminescence and active oxygen generation by activated neutrophils // Arch. Biochem. Biophys.— 1991.— Vol. 285.— P. 325-330.
10. Thelen M., Dewald B., Baggiolini M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst // Physiol. Rev.— 1993.— Vol.73.— P.797—821.
11. Widdicombe J.H., Wine J.J. The basis defect in cystic fibrosis // Trends Biochem. Sci.— 1991.— Vol.16.— P.474—477.
12. Zhou F.Q., Manahan F.J., Yu A.W., Rahman M.A., Nawab Z.M., Fisher K.A., Ing T.S. Effects of hypertonic peritoneal dialysis solution on neutrophil superoxide production // Artif. Organs.— 1990.— Vol.14.— P.410—412.

Поступила 14.06.96.