

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙТРОФИЛОВ, ЗАРАЖЕННЫХ ХАНТАВИРУСОМ

Ирина Николаевна ЛЯПУН¹, Наталья Геннадьевна ПЛЕХОВА^{1,2},
Галина Геннадьевна КОМПАНЕЦ¹, Илья Сергеевич СМИРНОВ²,
Лариса Михайловна СОМОВА¹

¹ ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова СО РАМН
690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1

² ФГАОУ ВПО Дальневосточный федеральный университет
690950, г. Владивосток, ул. Октябрьская, 27

Приведены данные по определению функциональной активности нейтрофилов, зараженных хантавирусом. Исследовались ферменты: 5'-нуклеотидаза, аденозинтрифосфатаза, лактатдегидрогеназа, миелопероксидаза, цитохромоксидаза и катионные белки. Выявлено, что хантавирус способен инфицировать нейтрофилы, оказывает выраженное воздействие на их кислородзависимую активность. При этом в клетках обнаружена тенденция к анаэробному пути энергопродукции, что согласуется с повышением активности лактатдегидрогеназы и цитохромоксидазы, тогда как малая активность миелопероксидазы в нейтрофилах, инфицированных хантавирусом, указывает на подавление защитной реакции клетки на внедрение этого вируса. Способность хантавируса адгезировать к поверхности нейтрофилов и изменять их морфофункциональные характеристики подтвердила сканирующая электронная микроскопия.

Ключевые слова: нейтрофилы, ферменты, сканирующая электронная микроскопия, хантавирус.

Иммунная функция нейтрофилов при инфекционных заболеваниях главным образом ассоциируется с фагоцитозом и продукцией цитотоксических компонентов, в том числе активных форм кислорода и азота радикальной и нерадикальной природы [7].

На данный момент для нейтрофилов обозначены три основные бактерицидные системы: 1) кислородзависимая система, в состав которой входит ряд ферментов дыхательной цепи (сукцинатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, цитохромоксидаза), НАДФН-оксидазный комплекс и миелопероксидазная система; 2) нитроксидобразующая система, включающая активные формы азота, производные NO-синтазы; 3) система белков нейтрофильных гранул (антимикроб-

ные белки, протеазы, сериновые протеиназы, металлопротеиназы) [4, 12].

Выявлено, что в нейтрофилах под воздействием вируса иммунодефицита человека синтезируются свободные кислородные радикалы, протеиназы, бактерицидные протеины и цитокины, которые как по отдельности, так и в совокупности оказывают влияние на регуляцию иммунного ответа организма [10].

Присутствие в периферической крови достаточного количества нейтрофилов и их наличие практически во всех органах обуславливают вероятность контактирования этих клеток с вирусами одними из первых. Ранее сообщалось о способности нейтрофилов взаимодействовать с вирусом иммунодефицита человека, цитомегало-

Ляпун И.Н. – младший научный сотрудник лаборатории патоморфологии и электронной микроскопии, e-mail: irina-lyapun@list.ru

Плехова Н.Г. – д.б.н., зав. лабораторией патоморфологии и электронной микроскопии, e-mail: pl_nat@hotmail.com

Компанец Г.Г. – к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории геморрагической лихорадки с почечным синдромом, e-mail: galkom@inbox.ru

Смирнов И.С. – аспирант междисциплинарной лаборатории электронной микроскопии и обработки изображений, e-mail: smirnov@letoi.phys.dvfu.ru

Сомова Л.М. – д.м.н., проф., главный научный сотрудник лаборатории патоморфологии и электронной микроскопии, e-mail: l_somova@mail.ru

вирусом, вирусом гриппа и Эпштейна – Барр, а также установлена индукция апоптоза нейтрофилов данными вирусами [8].

В настоящее время низкомолекулярные лизосомные катионные белки (полипептиды) нейтрофильных гранулоцитов названы дефенсинами (от англ. defense – защита, оборона). Они обладают антимикробной активностью в отношении различных организмов, таких как бактерии, грибы и оболочечные вирусы [2]. В нейтрофилах человека α -дефенсины хранятся в гранулах и секретируются из них при инфекционных и воспалительных состояниях [11]. Установлено, что под воздействием дефенсинов увеличивается поглощение вируса гриппа нейтрофилами, ингибируется его репликация и синтез белков в этих клетках. Указанные белки также ингибируют способность сурфактантного белка D увеличивать выработку H_2O_2 нейтрофилами при инфицировании их данным вирусом.

В современной вирусологии к роду *Hantavirus* относят этиологические агенты двух тяжелых заболеваний человека: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом и хантавирусный легочный синдром. Обе болезни распространяются грызунами-переносчиками. Вирусы геморрагической лихорадки с почечным синдромом переносятся грызунами Восточного полушария, в частности, полевой мышью *Apodemus agrarius*, а вирусы хантавирусного легочного синдрома – грызунами Западного полушария. Хантавирусы являются серологически-родственными членами семейства *Bunyaviridae*. Это вирусы с геномом из РНК отрицательной полярности, которая разделяется на три сегмента – Б, С и М, кодирующие соответственно вирусную транскриптазу, гликопротеины и белки нуклеокапсида. Первой стадией при вирусном инфицировании является адгезия вирусных частиц к специфическим рецепторам – гликопротеинам [13]. Для хантавируса клетками-мишенями служат моноциты и макрофаги [4, 9].

Целью нашего исследования являлось определение влияния хантавируса на морфофункциональную активность нейтрофилов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Первичную культуру нейтрофилов морских свинок получали, вызывая внутрибрюшинное воспаление путем введения стерильного 1 % мясопептонного бульона (5 мл). Через 18 ч перитонеальную полость животных промывали 10 мл холодной средой 199 с гепарином 5 ед/мл. Полученный лейкоконцентрат собирали, концентрацию клеток доводили до 4×10^6 кл/мл и разливали во флаконы с покровными стеклами по 1 мл

и плоскодонные планшеты по 100 мкл на лунку. Для адгезии взвесь нейтрофилов оставляли в CO_2 -инкубаторе, через 40 мин монослой нейтрофилов отмывали дважды от неадгезированных клеток.

Для заражения нейтрофилов был взят выделенный на клетках Vero-6 из суспензии легких инфицированной полевой мыши вирулентный штамм 308 геноварианта Far East вируса *Hantaan*. В экспериментах использовали супернатантную вирусосодержащую жидкость культуры клеток Vero-6 и СПЭВ, включавшую не менее 5 инфекционных единиц на нейтрофил, исходя из посадочной концентрации клеток и величины титра вируса, используемого для заражения. Затем продолжали инкубировать в среде 199, содержащей 20 % эмбриональной сыворотки коровы, 2 мкМ глутамин, 0,2 мкМ гентамицина и 100 ед/мл пенициллина. Время контакта нейтрофилов с вирусосодержащей жидкостью составило от 5 мин до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 18, 24, 48 ч. Эксперименты проводили трижды.

Предметные стекла с адгезированными на них клетками высушивали на воздухе и фиксировали в течение 30 с по собственной модификации в холодном 96° этаноле. Это позволило сохранить вирусный антиген на плазматической мембране клеток. Затем применяли стандартную постановку непрямого метода флуоресцирующих антител. Для определения вирусного антигена обработку монослоя клеток, зараженных хантавирусом, проводили с использованием гомологичной иммуноасцитической жидкости к вирулентному штамму хантавируса в разведении 1:64 и объеме 5–20 мкл. В качестве флуоресцирующей сыворотки для выявления антигена вируса использовали Zenon Labeling Kit Alexa Fluor 546 против иммуноглобулина мыши IgG1 (Sigma).

При исследовании поверхности нейтрофилов, зараженных вирулентным штаммом 308 хантавируса, клетки на покровных стеклах подвергали специальной обработке для исследования методом сканирующей электронной микроскопии [5], изображения образцов были получены на электронном микроскопе Ultra 55 (Carl Zeiss, Германия) с ускоряющим напряжением 0,8–1 кВ.

Определение активности АТФазы и 5'-нуклеотидазы (аденозинмонофосфатазы) проводили путем добавления к монослою клеток 20 мкл субстрата – соответственно 8 мг АТФ на 1 мл трис-HCl-буфера, pH 7,8, содержавшего 87 мг NaCl, 28,7 мг KCl, 52 мг $MgCl_2$ на 6 H_2O , и 4 мг АМФ на 1 мл такого же буфера, содержавшего 87 мг NaCl и 70 мг $MgCl_2$. Выявление активности лактатдегидрогеназы проводили по методу Лойда в собственной модификации [3].

Определение активности миелопероксидазы и цитохромоксидазы проводили путем добавления к монослою клеток 100 мкл раствора – соответственно 4 мг о-фенилендиамина на 10 мл фосфатно-цитратного буфера, рН 5,0, с добавлением 500 мкл 0,33 % перекиси водорода, и 2 мг/мл 3,3-диаминобензидина на основе 0,1 М ацетатного буфера, рН 5,5, с добавлением 1 г $MnCl_2$ и 300 мкл 33 % перекиси водорода. Выявление активности катионных белков (КБ) проводили при добавлении к монослою клеток 50 мкл раствора зеленого прочного (1 мг прочного зеленого на 1 мл метанолового трис-буфера, рН (8,0–8,2)).

Количество продуктов реакции вычисляли по поглощению раствора на спектрофотометре Labsystem Multiscan RC (Финляндия) при соответствующих для определяемых субстратов длинах волн.

Результаты спектрофотометрического исследования выражали в виде индекса стимуляции, который вычислялся в процентах как отношение разности между средними показателями оптической плотности растворов, содержащих продукты реакции зараженных нейтрофилов и интактных клеток, к среднему показателю оптической плотности раствора для интактных клеток. Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m), и представляли в виде $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью непрямого метода флуоресцирующих антител после 1 ч контакта хантавируса с нейтрофилами выявлялось специфическое свечение цитоплазмы в виде глыбок, и его интенсивность достигала $42,6 \pm 5,6$ усл. ед., максимальная величина составила $234,6 \pm 15,7$ усл. ед. после 4 ч инкубации, затем она кратковременно снижалась (5 ч) и вновь нарастала до 24 ч наблюдения, оставаясь на значительном уровне. В дальнейшем, к 2 сут наблюдения, количество антигенпозитивных нейтрофилов было минимальным вследствие деградации клеток.

Известно, что при хемотаксисе плазматическая мембрана нейтрофилов пространственно преобразуется, и данный процесс находится в прямой зависимости от активности ее эктоферментов – 5'-нуклеотидазы и АТФазы. Для дифференцировки активированных и покоящихся нейтрофилов исследователями используется тест по определению внутриклеточного содержания этих ферментов – оно высоко в покоящихся и крайне мало в активированных клетках [1]. Нами

выявлено, что динамика изменения активности АТФазы в нейтрофилах, зараженных хантавирусом, совпадает с изменением активности 5'-нуклеотидазы (рис. 1, а). Так, индекс стимуляции 5'-нуклеотидазы достигал минимального значения через 15 мин и 3 ч после заражения ($-20,30 \pm 0,65$ %), максимального – через 45 мин ($23,07 \pm 0,69$ %). Данные показатели указывали на выраженную стимуляцию нейтрофилов при их заражении хантавирусом.

Характерной особенностью метаболизма нейтрофилов является их способность под влиянием различных факторов мгновенно генерировать кислородные радикалы. Известно, что при проникновении и размножении вируса в клетках выявляется стимуляция кислородзависимых ферментных систем, к которым относятся митохондриальные ферменты третьего порядка – лактатдегидрогеназы и цитохромоксидазы. Нами установлено, что при заражении хантавирусом нейтрофилов динамика показателей активности лактатдегидрогеназы носила волнообразный характер (см. рис. 1, б). Так, индекс стимуляции данного фермента снижался до $-10,90 \pm 0,30$ % (15 мин), затем повышался до $34,80 \pm 0,35$ % (1 ч), повторное его уменьшение отмечалось через 2 ч ($-15,01 \pm 0,2$ %) с последующим увеличением до конца срока наблюдения ($20,12 \pm 0,9$ %). В то же время индекс стимуляции цитохромоксидазы в зараженных клетках снижался до $-18,7 \pm 0,4$ % (30 мин), затем повышался до $12,7 \pm 0,35$ % (45 мин) и вновь уменьшался до $-8,12 \pm 0,2$ % (1–3 ч) с последующим увеличением до конца срока наблюдения ($20,44 \pm 0,4$ %). Образование богатых энергией фосфорных соединений путем анаэробного гликолиза свидетельствует об интенсификации энергообеспечения нейтрофилов. Этот путь окисления может быть расценен как компенсаторный механизм адаптивной реакции нейтрофилов на воздействие стимула. Обнаруженную нами в начальные сроки после заражения хантавирусом повышенную активность лактатдегидрогеназы в нейтрофилах, на наш взгляд, следует расценивать как увеличение энергетического потенциала клетки, который служит проявлением адаптивной реакции нейтрофила на внедрение вируса. Активность фермента может также служить достоверным показателем уровня окислительного метаболизма в клетках.

Миелопероксидаза – гемопротейн, присутствующий в азурофильных гранулах нейтрофилов, выходящий при активации клетки в фаголизосому. Этот фермент принимает участие в преобразовании супероксидного анион-радикала $O_2^{\bullet-}$ в следующий мощный окислительный компонент – гипохлорную кислоту (HOCl), осуществ-

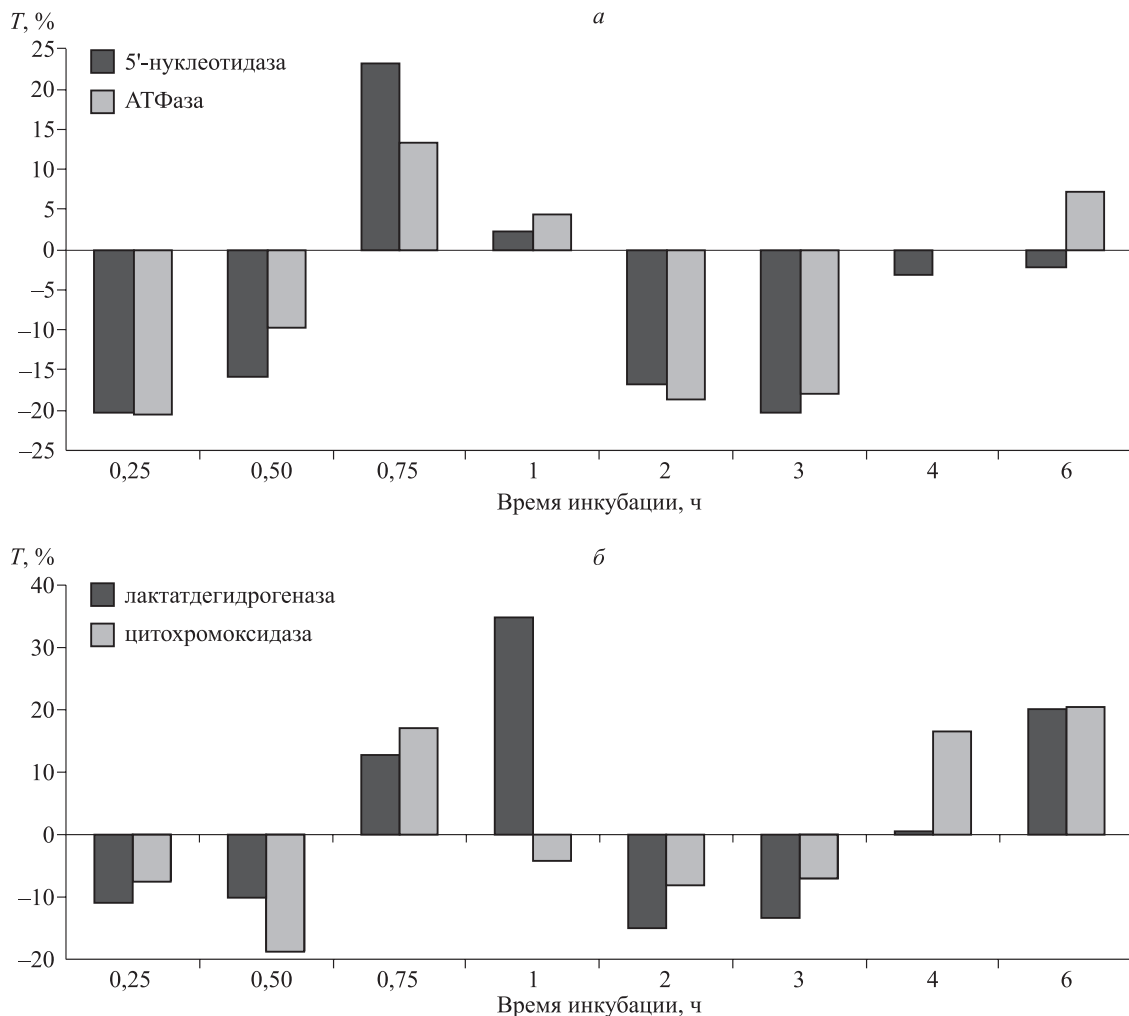


Рис. 1. Изменение активности 5'-нуклеотидазы, АТФазы (а) и лактатдегидрогеназы, цитохромоксидазы (б) в инфицированных ХВ нейтрофилах первичной культуры

вляя тем самым защиту клетки от избыточного количества реактивных посредников кислорода [12]. Выявлено, что при заражении хантавирусом нейтрофилов на начальных сроках индекс стимуляции миелопероксидазы имел низкие значения $-26,80 \pm 0,60\%$ (15 мин – 3 ч), увеличиваясь только к концу срока наблюдения (4–6 ч), когда он составил $47,03 \pm 0,45\%$. Таким образом, повышенная активность миелопероксидазы в зараженных нейтрофилах в конце срока наблюдения отражала защитную реакцию клетки на внедрение данного вируса.

Дефенсины (катионные белки) относятся к специфическим маркерам нейтрофилов, и выявление их активности при патологических состояниях дает представление о состоянии кислороднезависимой бактерицидной системы. Нами установлено, что показатели активности катионных белков в нейтрофилах, зараженных хантавирусом, возрастали на начальных сроках после заражения $12,09 \pm 0,14\%$ (15 мин), затем снижа-

лись $(-4,42 \pm 0,2\%)$ до конца срока наблюдения. Эти данные указывают на первоначальную стимуляцию кислороднезависимой системы нейтрофилов в ответ на внесение вируса с последующей дегрануляцией.

С помощью сканирующей микроскопии мы исследовали изменение поверхности нейтрофилов в процессе инфицирования их хантавирусом. В трехмерном пространстве неактивированные клетки имеют характерные треугольной формы выросты на поверхности, и, в целом, поверхность мембраны гладкая с небольшими выемками. При адгезии на стекле выросты исчезают, поверхность мембраны сглаживается, нейтрофилы становятся округлыми, и по их периметру наблюдаются псевдоподии сглаженной формы. Между клетками могут формироваться контакты посредством псевдоподий фибриллярного типа (рис. 2).

После 15 мин контакта с хантавирусом обнаруживались признаки активной стимуляции нейтрофилов. Это проявлялось возникновением

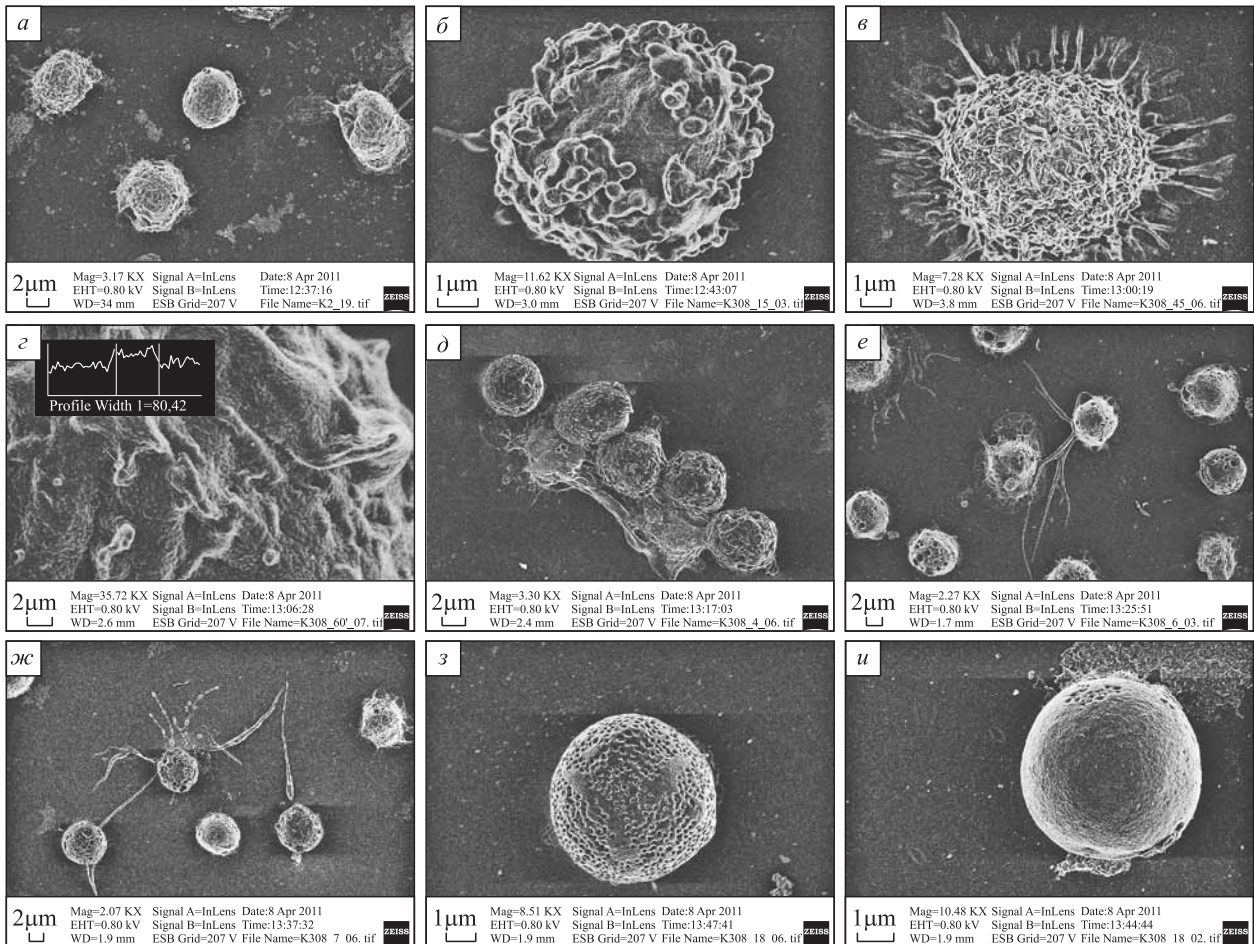


Рис. 2. Изменение архитектуры поверхности нейтрофилов под воздействием хантавируса: а – контроль; б – 15 мин контакта; в – 45 мин контакта; г – 1 ч контакта; д – 4 ч контакта; е – 6 ч контакта; ж – 7 ч контакта; з, и – 18 ч контакта

многочисленных округлой формы складок на поверхности клеток, которые свидетельствовали о специфической активации клеток. На поверхности нейтрофилов наблюдались вирусные частицы. Также обнаруживались группы клеток, находящиеся в плотном контакте посредством многочисленных вытянутых псевдоподий. Через 45 мин специфическая стимуляция клеток была более выражена, складчатость поверхности нейтрофилов увеличивалась, а также усиливалась адгезия клеток к поверхности, что приводило к уплощению клеток.

Нейтрофилы с наличием на поверхности экзотитированных компонентов обнаруживались через 1 ч контакта с хантавирусом. Поверхность отдельных клеток сглаживалась в результате исчезновения складок, и появлялись группы нейтрофилов, находящиеся в плотном контакте друг с другом. Это указывало на хемотаксическую активность клеток под воздействием вируса. С течением времени количество клеток со сглаженной поверхностью увеличивалось, помимо

этого появлялись сильно уплощенные клетки, на поверхности которых обнаруживалось большое количество вирусных частиц. Отмечалось еще большее округление нейтрофилов в результате практически полного исчезновения псевдоподий и складок на их поверхности, а также увеличение количества клеток, находящихся в плотном контакте друг с другом. После 6 ч контакта с хантавирусом все нейтрофилы округлялись, и их поверхность приобретала пенный вид в результате появления многочисленных выемок. Причем в местах прикрепления нейтрофилов к поверхности также происходило округление границ цитоплазмы. Данные изменения клеток с течением времени нарастали, наряду с этим появлялись немногочисленные фибриллоподобные псевдоподии, которые соединяли нейтрофилы между собой. В некоторых клетках количество таких псевдоподий было больше чем 1–2, и они были несколько иной формы, более утолщенной с пузырьвидными образованиями. После 18 ч инфицирования хантавирусом общее количество

клеток падало вследствие их деградации, оставшиеся нейтрофилы были округленной формы без псевдоподий, либо обнаруживались клетки с наличием межклеточного вещества на поверхности. Через 24 культура нейтрофилов полностью разрушалась.

Таким образом, установлено, что хантавирус способен адгезировать к поверхности нейтрофилов и оказывать влияние на их ферментативную активность. При этом в клетках обнаружена тенденция к анаэробному пути энергопродукции, что согласуется с повышением активности лактатдегидрогеназы и цитохромоксидазы. Подавление защитной реакции клетки на внедрение хантавируса выразилось в малой активности миелопероксидазы в нейтрофилах. Способность хантавируса адгезировать и изменять архитектуру поверхности нейтрофилов была подтверждена с помощью сканирующей электронной микроскопии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 16.740.11.0182).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кириличева Г.Б., Соловьева М.С., Батурина И.Г. и др. Чувствительность к мышиному токсину и уровень активности 5-нуклеотидазы макрофагов // Бюл. эксперим. биол. мед. 1992. (3). 296–297.
2. Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете. СПб.: Наука, 2006.
3. Плехова Н.Г., Сомова Л.М., Дробот Е.И. и др. Изменение метаболической активности макрофагов под влиянием вируса клещевого энцефалита // Биохимия. 2007. 72. (2). 236–246.
4. Плехова Н.Г., Ляпун И.Н., Сомова Л.М. и др. Реактивность клеток врожденного иммунитета в патогенезе хантавирусной инфекции // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2012. 85. (3). 296–300.
5. Ровенский Ю.А. Растровая электронная микроскопия нормальных и опухолевых клеток. М.: Медицина, 1979.
6. Borregaard N., Cowland J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte // Blood. 1997. 89. 3503–3521.
7. Kennedy A.D., DeLeo F.R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection // Immunol. Res. 2009. 43. 25–61.
8. Larochelle B., Flamand L., Gourde P. et al. Epstein-Barr virus infects and induces apoptosis in human neutrophils // Blood. 1998. 92. 291–299.
9. Sadeghi M., Eckerle I., Daniel V. et al. Cytokine expression during early and late phase of acute Puumala hantavirus infection // BMC Immunol. 2011. 12:65. doi:10.1186/1471-2172-12-65.
10. Salmen S., Montes H., Soyano A. et al. Mechanisms of neutrophil death in human immunodeficiency virus-infected patients: role of reactive oxygen species, caspases and map kinase pathways // Clin. Exp. Immunol. 2007. 150. 539–545.
11. Tesfaldet T., White M.R., Gantz D. et al. Human neutrophil defensins increase neutrophil uptake of influenza A virus and bacteria and modify virus-induced respiratory burst responses // J. Immunol. 2007. 178. 8046–8052.
12. Witko-Sarsat V., Rieu P., Descamps-Latscha L. et al. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects // Lab. Invest. 2000. 80. 617–653.
13. Yrlid U., Jenkins C.D., MacPherson G.G. Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions // J. Immunol. 2006. 176. 4155–4162.

MORPHOFUNCTIONAL ACTIVITY OF THE NEUTROPHILS INFECTED BY HANTAVIRUSES

**Irina Nikolaevna LYAPUN¹, Natal'ya Gennad'evna PLEKHOVA^{1,2},
Galina Gennad'evna KOMPANETS¹, Il'ya Sergeevich SMIRNOV²,
Larisa Mikhailovna SOMOVA¹**

¹ *FSBI «RI for Epidemiology and Microbiology named after G.P. Somov» of SB RAMS
690087, Vladivostok, Selskaya str., 1*

² *Far Eastern Federal University
690091, Vladivostok, Otyabrskaya str., 27*

The data on definition of the functional activity of the neutrophils infected by the Hantaviruses have been presented. The enzymes – 5'-nucleotidase, adenosine triphosphatase, lactate dehydrogenase, myeloperoxidase, cytochrome c oxidase and the cationic proteins have been studied. It has been revealed that the Hantavirus is capable to infect the neutrophils, has evident influence to their oxygen forming activity. Thus the tendency to anaerobic energy production pathway in the cells has been revealed, that agrees with the increase in the LDH и CCO activity. Whereas a low MPO activity in the neutrophils infected by the Hantavirus indicates the suppression of the cell protection reaction upon the virus introduction. The Hantavirus ability to adhere to the neutrophils surface and change their morphological and functional characteristics was confirmed by the scanning electron microscopy.

Key words: neutrophils, enzymes, scanning electron microscopy, hantavirus.

*Lyapun I.N. – junior researcher of the laboratory of pathomorphology and electron microscopy,
e-mail: irina-lyapun@list.ru*

*Plekhova N.G. – doctor of biological sciences, head of the laboratory of pathomorphology and electron microscopy,
e-mail: pl_nat@hotmail.com*

*Kompanets G.G. – candidate of medical sciences, leading researcher of the laboratory of hemorrhagic fever with
renal syndrome, e-mail: galkom@inbox.ru*

*Smirnov I.S. – postgraduate student of the laboratory interdisciplinary of electron microscopy and image processing,
e-mail: smirnov@lemoi.phys.dvgu.ru*

*Somova L.M. – doctor of medical sciences, professor, chief researcher of the laboratory of pathomorphology
and electron microscopy, e-mail: l_somova@mail.ru*