

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616-002-008.953-092

©Коллектив авторов

РОЛЬ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ НЕЙТРОФИЛОВ В РАЗВИТИИ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ТЕРМИЧЕСКИХ ОЖОГАХ КОЖИ

Е.В. Михальчик^{1*}, Л.И. Будкевич², Ю.А. Питерская², Л.Ю. Пеньков², Т.С. Астамирова²,
Н.В. Смолина¹, Т.В. Вахрушева¹, О.М. Панасенко¹

¹Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины,
119435, Москва, М. Пироговская ул., 1а; тел./факс: +7 (499) 246-4409; эл. почта: lemik2007@yandex.ru
²Детская городская клиническая больница №9 им. Г.Н. Сперанского, Москва

У детей (n=16) с термическими ожогами кожи площадью более 20% поверхности тела в ранний период (1-7 сутки) после травмы измеряли люминол-зависимую хемилюминесценцию (ХЛ) нейтрофилов крови, стимулированных форбол-12-миристан-13-ацетатом (ФМА), активность миелопероксидазы (МПО) в нейтрофилах и плазме крови. Уровень ХЛ стимулированных нейтрофилов был выше у пациентов, чем у здоровых детей из группы сравнения (p<0,01). В 40% образцов крови пациентов обнаружена повышенная активность МПО в нейтрофилах, а в 57% образцов – активность МПО в плазме. Альбуминовая фракция плазмы обожженных усиливала ХЛ ответ крови здоровых доноров на ФМА. Полученные данные свидетельствуют о том, что острая воспалительная реакция в ответ на термический ожог приводит к активации нейтрофилов и сопровождается высвобождением МПО в плазму крови. Модификация белков плазмы крови, в первую очередь альбумина, с участием МПО может стимулировать активацию нейтрофилов и провоцировать дальнейшее развитие воспалительной реакции организма в ответ на травму.

Ключевые слова: ожоги, хемилюминесценция, нейтрофилы, миелопероксидаза, альбумин

DOI 10.18097/PBMC20166205584

ВВЕДЕНИЕ

Термическая травма уже при повреждении 15% поверхности тела (п.т.) вызывает синдром системного воспалительного ответа с резким усилением хемилюминесценции (ХЛ) лейкоцитов крови [1]. Это свидетельствует об их активации, в которой принимают участие цитокины: фактор некроза опухолей (ФНО-альфа), интерферон, интерлейкин-8, гранулоцит-колониестимулирующий фактор [2]. Инфильтрация высокоактивных нейтрофилов в слизистые оболочки (в первую очередь, кишечника и дыхательных путей) создаёт риск их повреждения и развития полиорганной недостаточности [3]. При дегрануляции активированных нейтрофилов происходит высвобождение из клетки различных бактерицидных агентов, в том числе фермента миелопероксидазы (МПО) [4]. МПО катализирует окисление галогенидов до соответствующих гипогалогидных кислот, главным образом НОСl и НОВг. Последние являются сильными окислителями, способными модифицировать структуру и изменять функцию многих биологически важных молекул, включая белки [5]. Так, альбумин плазмы крови человека, модифицированный НОСl или НОВг, повышает активность нейтрофилов крови *in vitro* [6, 7].

Цель данной работы – с помощью хемилюминесцентного метода изучить у пациентов детского возраста с термическими ожогами кожи взаимосвязь между активностью МПО (в нейтрофилах и в плазме крови) и способностью нейтрофилов крови продуцировать активные формы кислорода и хлора.

МЕТОДИКА

Под наблюдением находились 16 детей (9 мальчиков и 7 девочек в возрасте от 4 до 12 лет) с термическими ожогами кожи общей площадью 20-60% п.т., из которой 22±17% приходилось на глубокие ожоги. Пациенты поступили на лечение в детскую городскую клиническую больницу №9 г. Москвы им. Г.Н. Сперанского в течение 1–3 суток после ожога. Всем пациентам в период наблюдения (1–7 сутки после травмы, если не указано особо) были проведены операции по удалению нежизнеспособных тканей с одномоментной или отсроченной кожной аутопластикой. В исследование были включены пациенты, не имеющие хронических заболеваний и очевидных признаков инфекции на момент поступления в больницу. У 7 пациентов в результате травмы развились осложнения: пневмония (2 случая), язвы желудочно-кишечного тракта (5 случаев). Забор крови на исследование проводили с интервалами в 1–2 дня на основании информированного согласия, полученного от родителей. Группу сравнения составили здоровые дети, обследовавшиеся перед плановыми операциями по удалению грыжи (n=24).

Соли для буферных растворов, бикарбонатный буфер Кребса-Рингера (рН 7,4), градиентные растворы Histopaque с плотностью 1,077 и 1,119 г/мл, человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), Тритон X-100, дигидрохлорид *o*-дианизидина, 30%-ный раствор пероксида водорода (H₂O₂), форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА), люминол, полиэтиленгликоль (ПЭГ) 3000 были получены от фирмы “Sigma-Aldrich” (США).

МИЕЛОПЕРОКСИДАЗА НЕЙТРОФИЛОВ В РАЗВИТИИ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ОЖОГАХ

Забор крови производили в вакутейнеры с гепарином в качестве антикоагулянта. Кровь немедленно использовали для выделения нейтрофилов и измерения ХЛ. Для выделения нейтрофилов кровь наслаивали на двойной градиент плотности 1,119 и 1,077 г/мл и центрифугировали в течение 35 мин при 400 g. Клетки отмывали в буфере Кребса-Рингера, и в полученной суспензии определяли их концентрацию, используя для подсчёта клеток камеру Горяева. Плазму получали центрифугированием крови в течение 15 мин при 900 g.

Альбуминовую фракцию плазмы крови получали с использованием 30%-ного раствора ПЭГ 3000 в 10 mM Na-фосфатном буфере, pH 7,4, как описано ранее [6]. Концентрацию белка определяли по методу Лоури.

Для проведения хемилуминесцентного анализа аликвоты цельной крови (10 мкл) или 100 мкл суспензии нейтрофилов, содержащей 5×10^6 клеток/мл, добавляли в кювету люминометра Wallach-1240 ("LKB", Финляндия) к 1 мл буфера Кребса-Рингера с люминолом (0,2 mM). Измерения проводили в режиме слежения при 37°C и постоянном перемешивании. После регистрации спонтанной ХЛ в течение 5 мин в образец добавляли стимулятор нейтрофилов ФМА (конечная концентрация 100 нг/мл) и регистрировали стимулированную ХЛ. В экспериментах с использованием крови здоровых добровольцев добавление ФМА производили через 5 мин после того, как в образец, содержащий кровь, вносили плазму в количестве 10 мкл или её альбуминовую фракцию (или ЧСА) до конечной концентрации 0,5 мг белка/мл. ХЛ ответ на ФМА оценивали как разность между максимальными уровнями (в мВ) стимулированной и спонтанной ХЛ.

Пероксидазную активность в лизате нейтрофилов или в плазме оценивали по окислению *o*-дианизидина при добавлении H_2O_2 [2, 8]. Нейтрофилы лизировали с помощью 0,1% тритона X-100; концентрацию белка в лизате определяли по методу Лоури. Количество окисленного *o*-дианизидина, образовавшегося в течение первых 5 мин реакции, рассчитывали, используя молярный коэффициент экстинкции $\epsilon_{560} = 20040 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [6]. Результаты выражали в единицах (Ед): 1 Ед = 1 мкмоль/5 мин. Удельную активность МПО пересчитывали на г белка клеточного лизата (Ед/г) или на объём плазмы (Ед/л).

Результаты представлены как средние значения \pm стандартные отклонения. Достоверность различий средних величин рассчитывали с применением U-критерия Манна-Уитни, считая различия достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Коэффициенты корреляции рассчитывали по методу Спирмена. Для обработки результатов использовали пакет программ Statistica 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По данным общего анализа крови, острая воспалительная реакция, начиная с первых суток после травмы до начала хирургического лечения (1-6 сутки), характеризовалась ростом СОЭ

(23 ± 12 мм/ч при норме 2–10 мм/ч), увеличением количества лейкоцитов ($12,3 \pm 2,5$ млн./мл при норме 4–9 млн./мл) и содержания палочкоядерных лейкоцитов ($17,2 \pm 9,4\%$ при норме 1–6%). Уровень ХЛ ответа цельной крови на ФМА, начиная с первых суток после получения ожоговой травмы, был значительно выше, чем в группе сравнения, и коррелировал ($R = 0,72$, $p < 0,01$) с величиной ХЛ ответа нейтрофилов, выделенных из этой же крови (рис. 1).

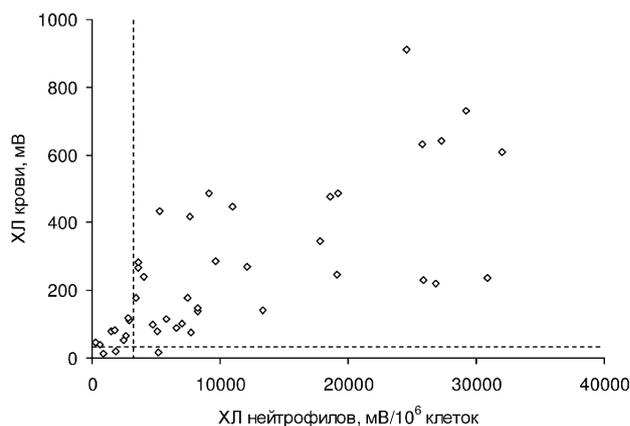


Рисунок 1. Зависимость между хемилуминесцентным ответом (ХЛ) цельной крови и ХЛ выделенных нейтрофилов на ФМА у пациентов с термическим ожогом кожи ($n=16$) в период 1-7 суток после травмы. $R = 0,72$; $p < 0,001$. Пунктирные линии обозначают верхнюю границу значений в группе сравнения ($n=24$).

Активность МПО в нейтрофилах отклонялась от показателей для группы сравнения как в сторону больших (в 40% образцов), так и в сторону меньших (в 26% образцов) значений. В нейтрофилах из образцов крови с высокими ХЛ ответами была обнаружена тенденция к снижению активности МПО (рис. 2).

Обратный характер зависимости между величиной ХЛ ответа цельной крови и активностью МПО в нейтрофилах наблюдался у большинства пациентов. В качестве примера на рисунке 3 представлены данные, полученные для пациента Б (термический ожог кожи 50% п.т.). Видно, что практически при неизменном (при этом повышенном) содержании нейтрофилов в крови изменение ХЛ активности крови было достаточно сильно выражено и сопровождалось синхронным противоположным изменением активности МПО в нейтрофилах.

Пероксидазная активность в плазме крови пациентов уже в ранние сроки после травмы (1–3 день) превышала норму в 50% образцов (медиана 227 Ед/л у пациентов и 77 Ед/л в группе сравнения) и прямо зависела от общей площади ожога (рис. 4).

В присутствии плазмы пациентов величина ХЛ ответа крови здоровых добровольцев на ФМА была выше, чем в присутствии плазмы других здоровых добровольцев, однако это различие не было достоверным. При добавлении к крови здоровых добровольцев альбуминовой фракции, выделенной из плазмы пациента, величина ХЛ ответа на ФМА достигала $189 \pm 46\%$ от значений, полученных в отсутствие альбумина, и коррелировала

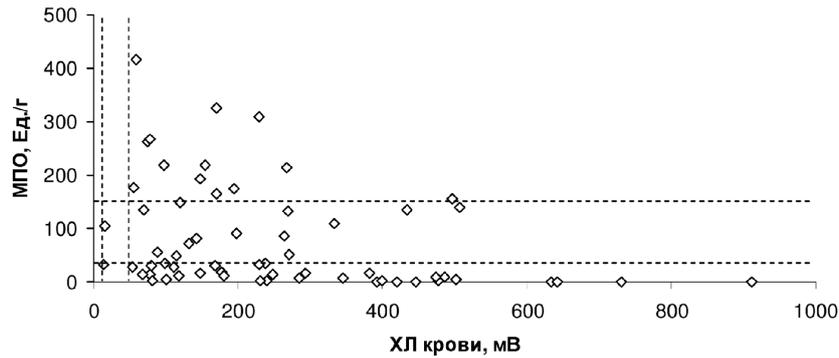


Рисунок 2. Зависимость между хемилуминесцентным ответом (ХЛ) цельной крови на ФМА и активностью миелопероксидазы (МПО) в выделенных нейтрофилах у пациентов с термическим ожогом кожи (n=16) в период 1-7 суток после травмы. $R = -0,35$; $p < 0,05$. На оси Y: МПО, Ед/г - активность МПО в Ед/г белка нейтрофилов. Пунктирные линии обозначают верхнюю и нижнюю границы значений в группе сравнения (n=24).

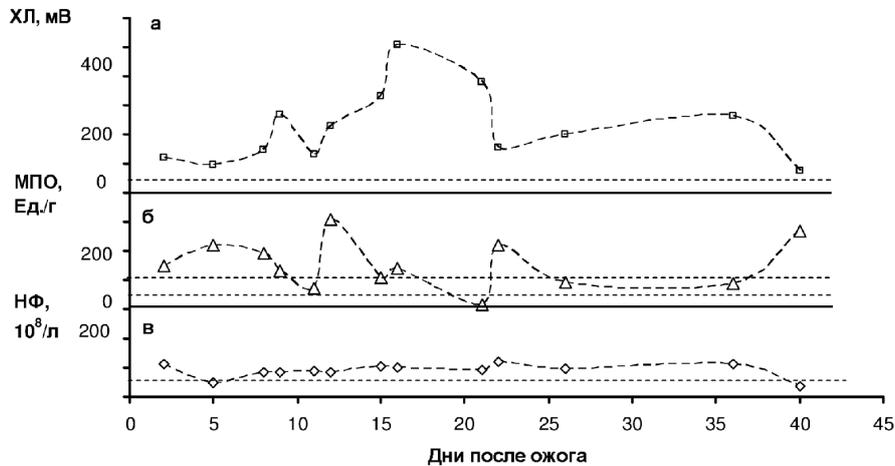


Рисунок 3. Динамика показателей воспаления у пациента Б. с термическим ожогом кожи, составляющим 50% поверхности тела. а - хемилуминесцентный ответ (ХЛ) цельной крови на ФМА; б - активность миелопероксидазы (МПО) в нейтрофилах; в - содержание нейтрофилов в крови. На оси Y: ХЛ, мВ - ХЛ цельной крови в мВ; МПО, Ед/г - активность МПО в Ед/г белка нейтрофилов; НФ, $10^9/л$ - концентрация нейтрофилов (НФ) в крови. Пунктирные линии обозначают границы значений в группе сравнения (n=24): верхнюю - для (а) и (в); верхнюю и нижнюю - для (б).

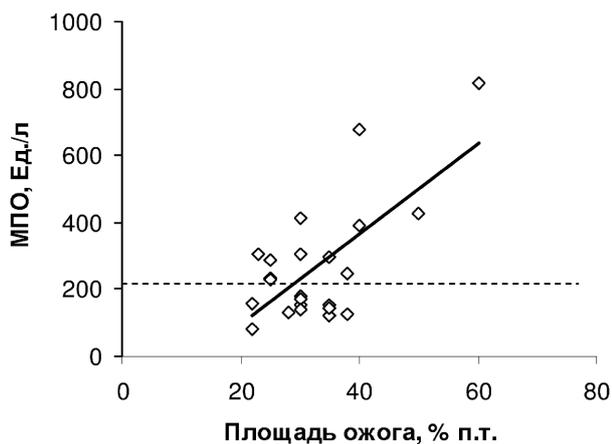


Рисунок 4. Зависимость между площадью ожога и активностью миелопероксидазы (МПО) в плазме пациентов с термическим ожогом кожи (n=16) в ранний период после травмы (1-3 сутки). $R=0,68$; $p < 0,05$. На оси X: площадь ожога в % от поверхности тела (п.т.). На оси Y: МПО, Ед/л - активность МПО в Ед/л плазмы. Пунктирная линия обозначает верхнюю границу значений в группе сравнения (n=24).

с пероксидазной активностью в том же образце плазмы ($R=0,5$; $p < 0,05$). ПЭГ или ЧСА не вызвали достоверного повышения ХЛ ответа крови здоровых добровольцев на ФМА.

Повышение количества лейкоцитов при воспалении является нормальной реакцией неспецифического звена иммунитета. Падение активности нейтрофилов ведет к септическим осложнениям, а гиперактивация – к развитию органной недостаточности [9]. В процессе активации нейтрофилов происходит сборка мембранной NADPH-оксидазы и запуск реакций с участием фермента МПО, содержащегося в азурофильных гранулах, результатом чего является продукция нейтрофилами активных форм кислорода ($\cdot O_2^-$, H_2O_2 , $\cdot OH$ -радикала и др.) и галогенов ($HOCl$, $NOBr$ и др.) [5]. Люминол-зависимая хемилуминесценция нейтрофилов вызывается, главным образом, окислением люминола $HOCl$ – основным продуктом каталитической активности МПО [10].

Согласно полученным в этой работе данным, у обследованных пациентов нейтрофилы, как выделенные, так и в цельной крови, обладали повышенной способностью к активации,

МИЕЛОПЕРОКСИДАЗА НЕЙТРОФИЛОВ В РАЗВИТИИ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ОЖОГАХ

и в 40% образцов наблюдался повышенный уровень активности внутриклеточной МПО. В то же время выявлялась отрицательная зависимость между ХЛ активностью нейтрофилов в крови и активностью МПО в выделенных нейтрофилах. В 26% образцов активность МПО была ниже нормы. Вероятно, с ростом активности циркулирующих нейтрофилов может происходить их дегрануляция в крови, о чём свидетельствует повышенная более чем в 50% образцов пероксидазная активность в плазме крови. Нельзя исключить также дегрануляции части нейтрофилов в ходе их выделения, что следует учитывать при анализе результатов по измерению ХЛ выделенных нейтрофилов. Внеклеточная МПО может участвовать в модификации белков плазмы крови, что ранее было показано в модельной системе с альбумином [11], а хлорированный альбумин при добавлении к нейтрофилам способствует экзоцитозу МПО [6, 7].

Поскольку альбуминовая фракция плазмы пациентов усиливала ХЛ ответ крови здоровых добровольцев на ФМА, то можно предположить, что модифицированный в результате воспаления альбумин будет способствовать дальнейшей активации нейтрофилов крови, тем самым усиливая риск развития полиорганной поврежденности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Измерение активности МПО в нейтрофилах или её содержания в плазме крови, а также ХЛ ответ цельной крови на стимулятор могут

служить информативными критериями выраженности воспалительной реакции организма при термических ожогах кожи.

Работа выполнена при поддержке Федерального медико-биологического агентства России в рамках государственного заказа, шифр темы "Воспаление".

ЛИТЕРАТУРА

1. Будкевич Л.И., Михальчик Е.В., Пеньков Л.Ю., Питерская Ю.А. (2009) Детская хирургия, №1, 40-43.
2. Михальчик Е.В., Питерская Ю.А., Будкевич Л.И. и др. (2009) Бюлл. exper. биол., **148**, 524-528.
3. Partrick D.A., Moore F.A., Moore E.E. et al. (1996) Am. J. Surg., **172**, 425-429.
4. Klebanoff S.J. (2005) J. Leukoc. Biol., **77**, 598-625.
5. Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В. (2013) Усп. биол. химии, **53**, 195-244.
6. Михальчик Е.В., Смолина Н.В., Астамирова Т.С. и др. (2013) Биофизика, **58**, 681-689.
7. Gorudko I.V., Grigorieva D.V., Shamova E.V. et al. (2014) Free Radic. Biol. Med., **68**, 326-334.
8. Andrews P.S., Krinsky N.J. (1985) in CRC Handbook of methods for oxygen radical research (Greenwald R.A., ed.), Florida, pp. 297-302.
9. Bröchner A.C., Toft P. (2009) Scand. J. Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine, **17**, 43.
10. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. (2009) Усп. биол. химии, **49**, 341-388.
11. Salavej P., Spalteholz H., Arnhold J. (2006) Free Radic. Biol. Med., **40**, 516-525.

Поступила: 16. 06. 2016.
Принята к печати: 31. 08. 2016.

THE ROLE OF NEUTROPHIL MYELOPEROXIDASE IN THE DEVELOPMENT OF INFLAMMATION AFTER THERMAL SKIN BURNS

*E.V. Mikhalechik¹, L.I. Budkevich², Yu.A. Piterskaya², L.Yu. Penkov², T.S. Astamirova²,
N.V. Smolina¹, T.V. Vakhrusheva¹, O.M. Panasenko¹*

¹Federal Scientific Clinical Centre of Physical Chemical Medicine,
1a M. Pirogovskaya str., Moscow, 119435 Russia; tel/fax : +7 (499) 246-4409; e-mail: lemik2007@yandex.ru
²Speransky Pediatric Clinical Hospital No.9, Moscow, Russia

In the blood of children (n=16) with large thermal skin burns (> 20% of total body surface), luminol-dependent chemiluminescence (CL) of neutrophils stimulated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and myeloperoxidase (MPO) activity in neutrophils and plasma were assayed in the early period (1-7 post-burn days). PMA-stimulated neutrophils in thermally injured patients produced higher CL than those in a reference group of healthy children (n=24), p<0.01. MPO activity was elevated in neutrophils and plasma in 40% and 57% of patients' blood samples, respectively. The albumin fraction isolated from plasma of burned patients enhanced the PMA-stimulated CL response of blood samples from healthy volunteer. Our results suggest that the acute inflammatory response induced by thermal injury involves activation of neutrophils and is accompanied by MPO release into the plasma. MPO-mediated modification of serum albumin induces its capacity to prime neutrophils and thus to enhance further inflammatory reaction.

Key words: burns, chemiluminescence, neutrophils, myeloperoxidase, albumin