

Моделирование функциональных характеристик нейтрофильных гранулоцитов доноров под действием плазмы крови пациентов с ожогами различной степени тяжести

О. В. Петракова

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Modelling of Function Parameters of Donor's Neutrophilic Granulocytes with Blood Plasma of Patients with Different Severity of Burn Injury

O. V. Petrakova

Bielorussian State Medical University, Minsk, Belarus

Аннотация

Цель исследования — оценить характер воздействия плазмы крови пациентов с ожогами различной степени тяжести, находящихся на разных стадиях болезни на адгезивную и метаболическую активность нейтрофилов крови доноров. Выявлено выраженное подавляющее влияние плазмы крови пациентов с обширной ожоговой травмой в отношении метаболической активности нейтрофилов доноров и стимулирующее действие плазмы на адгезивную активность клеток доноров.

Ключевые слова

Плазма, нейтрофилы, адгезия, метаболическая активность.

В настоящее время доказано, что развитие воспалительного ответа на большинство инфекционных и неинфекционных агентов сопряжено, в первую очередь, с изменением функционального состояния лейкоцитов. Результирующая реакция иммунной системы в основе своей зависит от взаимодействия ряда клеток и огромного количества растворимых продуктов этих и других клеток, включая интерлейкины, хемокины, белки системы комплемента. Однако, не все из растворимых продуктов клеток, принимающих участие в реализации иммунного ответа, на настоящий момент идентифицированы, а характер действия уже известных факторов часто до конца не ясен. Но все они являются частью саморегулирующейся гуморальной сети межклеточных взаимодействий целостного организма [1], и потому для оценки их совместного влияния на клетки иммунной системы недостаточно определения одного из этих факторов или даже нескольких. Оценка результирующего системного действия этих факторов может стать возможной при исследовании

Summary

The aim of research — to estimate the character of blood plasma effects of patients with different severity of burn injury on adhesive and metabolic activity of donor's neutrophilic granulocytes. Concerning metabolic activity of donor's neutrophils was detected a pronounced overwhelming influence of plasma of severe burned patients, and stimulative effect was detected concerning adhesive activity of cells.

Keywords

Plasma, neutrophils, adhesion, metabolic activity.

влияния сыворотки крови пациентов на функциональные параметры клеток доноров [2].

Материалы и методы.

Объект исследования — плазма крови пациентов с ожогами различной степени тяжести, находящихся на разных стадиях течения болезни.

Цель исследования — оценить характер воздействия плазмы крови пациентов с ожогами различной степени тяжести, находящихся на разных стадиях болезни на адгезивную и метаболическую активность нейтрофилов крови доноров.

Обследован 51 пациент, находящийся на лечении в Республиканском ожоговом центре при больнице скорой медицинской помощи (БСМП) г. Минска после получения ожоговых травм I–II–III–IV степени. Все пациенты были разделены в зависимости от тяжести ожогового повреждения и от наличия либо отсутствия признаков синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) на две группы:

1. Группа А — 18 пациентов, у которых в ходе болезни наблюдалось развитие ССВО. Все пациенты находились на интенсивном лечении в ПИТР взрослого ожогового отделения БСМП. Диагноз ССВО определяли согласно общепринятым критериям [3], он наблюдался у всех больных спустя 1–3 суток от начала заболевания. Индекс тяжести поражения по Франку в этой группе составил от 40 до 100 ЕД. Общая площадь ожогов у пациентов этой группы составила от 15% до 60% (глубокого от 10% до 40%), некоторые пациенты имели ингаляционную травму. В 1–2 сутки после повреждения все пациенты перенесли ожоговый шок. Длительность нахождения в ПИТР пациентов составила 20–85 суток. Возраст — от 17 до 54 лет.
2. Группа В — 33 пациента, у которых не регистрировалось в ходе болезни ССВО. Все пациенты находились на лечении во взрослом ожоговом отделении БСМП. Площадь ожоговых повреждений у пациентов этой группы составила от 5 до 20%, индекс тяжести поражения — от 5 до 20 ЕД. Всем пациентам проводилась антибиотикотерапия, а также местное лечение ограниченных ожогов. Все пациенты выжили. Длительность нахождения на лечении составила 6–38 суток. Возраст — от 20 до 56 лет.

Забор материала (цельную кровь, стабилизированную гепарином) проводили на 1–3 сутки после поступления пациента в больницу, и далее каждые 7 суток до момента перевода из ПИТР (группа А) или выписки пациента (группа В). Кровь центрифугировали с получением плазмы, которую аликвотировали в эппендорфах и замораживали при $(-25)^{\circ}\text{C}$. Замороженные образцы хранили не более 3-х месяцев, размораживали однократно, непосредственно перед проведением исследований.

Для определения характера воздействия плазмы пациентов на функциональные параметры гранулоцитов доноров в лунки плоскодонного 96-луночного планшета вносили клеточную суспензию нейтрофилов доноров в концентрации $4 \cdot 10^6$ кл/мл (по 50 мкл для исследования метаболической активности и по 100 мкл для исследования адгезивной активности). Нейтрофилы выделяли из цельной гепаринизированной крови традиционным способом с осаждением эритроцитов и использованием градиента плотности [4]. Контролировали чистоту клеточной суспензии: нейтрофилы составляли 98–99%. Жизнеспособность клеток оценивали в тесте с трипановым синим: во всех опытах она составляла не менее 98%. Далее, в лунки к нейтрофилам доноров добавляли по 100 мкл плазмы пациента, в качестве контроля использовали пулированную плазму от 10 доноров. Для изучения адгезивной активности клеток планшет инкубировали при 37°C в течение 1,5 часов, после чего учет реакции проводили согласно методу, описанному del Pozo M. A и соавт. [5]. Окраску клеточного монослоя проводили раствором кристаллического фиолетового. Учет реакции проводили при помощи многоканального спектрофотометра при длине волны 540 нм. Для исследова-

ния метаболической активности через 30 минут после начала инкубации клеток с плазмой пациента добавляли в лунки по 50 мкл 0,4% раствора нитросинего тетразолия, тщательно ресуспендировали и далее, исследование активности клеток проводили как описано в Киселевой Е.П. и соавт. [6]. Время инкубации клеток с раствором нитросинего тетразолия составило 30 минут. Учет реакции проводили при помощи многоканального спектрофотометра при длине волны 620 нм.

Результаты исследования выражали в виде индексов воздействия (ИВ). В случае адгезивной активности ИВ вычисляли как отношение процента адгезировавшихся клеток при их инкубации с плазмой пациентов к проценту клеток, адгезировавшихся при их инкубации их с пулированной плазмой доноров. В случае метаболической активности ИВ вычисляли как отношение количества молей образовавшегося диформаза при инкубации клеток с плазмой пациента к количеству молей диформаза, образовавшегося при инкубации клеток с плазмой доноров.

В качестве интегрального показателя, характеризующего время, прошедшее с момента получения травмы и общую длительность заболевания был введен дополнительный параметр — процент болезни (ПБ), равный отношению количества суток, прошедших со времени получения травмы на момент исследования к общей длительности болезни (время нахождения в ПИТР для группы А и время до выписки для группы В), умноженное на 100%. Ранее нами было отмечено, что в зависимости от ПБ адгезивная активность клеток претерпевает определенные изменения в ходе болезни как в группе А, так и в группе В [7]. Динамика изменений адгезивной активности клеток в обеих группах имела сходный характер (рис.1): на начальном этапе болезни адгезивная активность клеток увеличивалась, после чего в ходе заболевания регистрировалось ее снижение (на рисунке обозначено стрелкой 1), за которым следовал рост адгезивной активности клеток (на рисунке обозначено стрелкой 2).

Таким образом, основываясь на динамических изменениях адгезивной активности клеток в зависимости от ПБ в группах А и В были сформированы подгруппы:

- группа А1/группа В1 – пациенты, у которых регистрировалась высокая адгезивная активность клеток с тенденцией к ее снижению. ПБ у этих пациентов в группе А составил не более 25% (2–18 суток), в группе В — не более 13% (1–3 суток);
- группа А2/группа В2 — пациенты, со сниженной адгезивной активностью клеток. ПБ в группе А составил 22–56% (9–42 суток), в группе В — 10–33% (3–10 суток);
- группа А3/В3 — пациенты с тенденцией к увеличению адгезивной активности клеток. ПБ в группе А составил 50–80% (9–56 суток), в группе В — 30–55% (4–16 суток);
- группа А4/В4 — пациенты с высокой адгезивной активностью клеток и тенденцией к ее снижению. Забор материала в группе А проводили незадолго до перевода больного из ПИТР, ПБ в этой группе

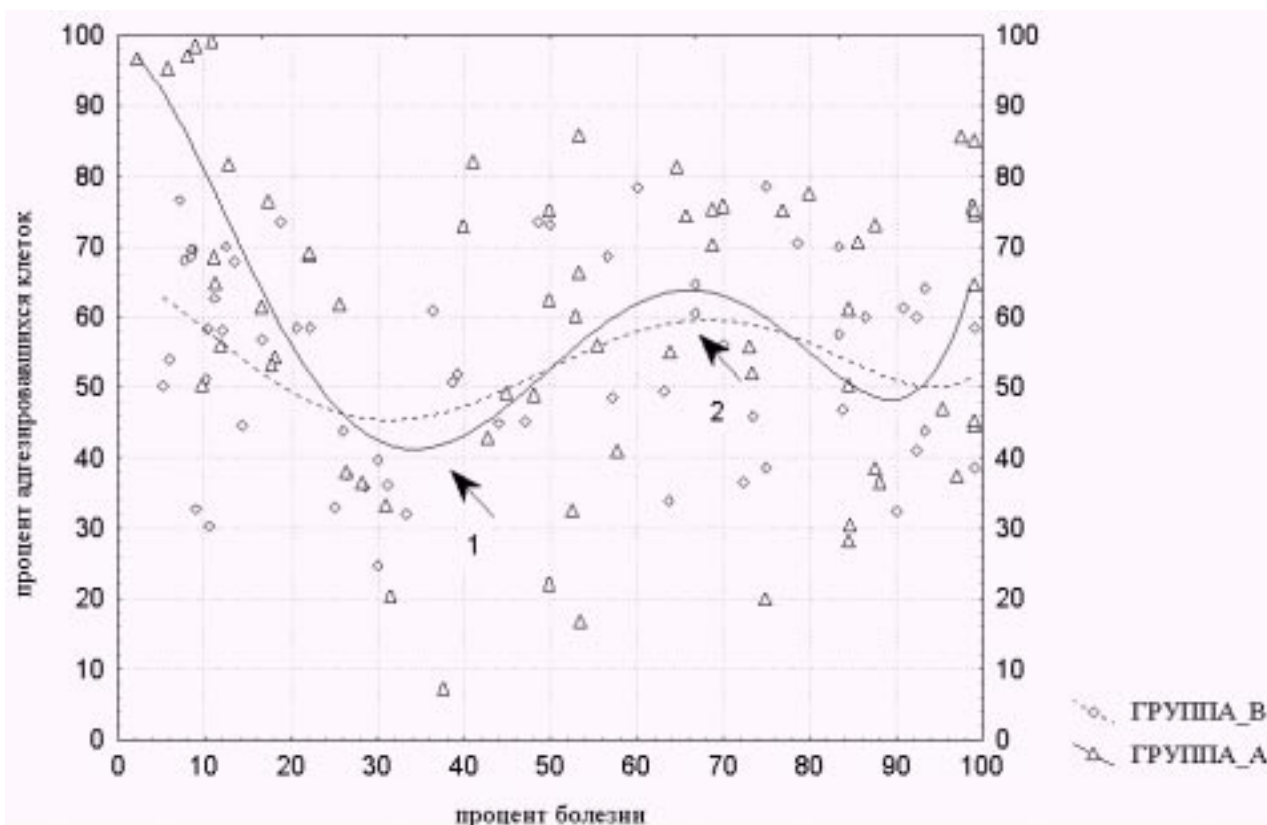


Рис. 1. Динамика адгезивной активности нейтрофилов пациентов групп А и В в зависимости от «процента болезни».

составил 73–100% (11–80). В группе В ПБ составил 50–78% (7–25 сутки);

- группа В5 –пациенты группы В незадолго до выписки, ПБ составил 72–100% (5–41 сутки).

Статистическая обработка полученных данных была проведена с использованием пакета Statistica 6.0. Для сравнения относительных частот признака (увеличение или уменьшение активности клеток в группах после из инкубации с плазмой пациентов) в двух независимых группах применяли точный критерий Фишера (двусторонний тест). Этот метод статистической обработки данных позволяет сравнивать группы по бинарному признаку в случаях, когда число наблюдений менее 5, а так же когда частота встречаемости признака в группе равна нулю.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что плазма пациентов обеих групп обладает способностью моделировать активность нейтрофилов доноров. В ряде групп были выявлены разнонаправленные изменения в активности клеток, и степень этих изменений в каждой из групп пациентов сильно варьировала — стандартное отклонение значений относительно средней в некоторых группах превышало среднее значение показателя по группе. Это сделало невозможным проведение количественного анализа воздействия плазмы пациентов на функциональные характеристики нейтрофилов доноров. Оценку влияния плазмы пациентов проводили с учетом качественного признака — увеличение или

снижение активности клеток доноров при инкубации их с плазмой пациента. Полученные результаты представлены в таблицах 1 и 2.

Анализ действия плазмы крови пациентов с обширными ожоговыми повреждениями на функциональные характеристики нейтрофилов крови доноров показал, что плазма пациентов этой группы обладает преимущественно стимулирующим действием на адгезивную активность клеток и ингибирующим в отношении их метаболической активности.

В группе В не было выявлено достоверных отличий в характере влияния плазмы крови на нейтрофилы доноров от одной группы пациентов к другой в течении болезни ни на метаболическую, ни на адгезивную активность клеток доноров. На всем протяжении болезни характер действия плазмы не менялся. Можно лишь предположить, что на адгезивную активность клеток плазма оказывала преимущественно угнетающее действие, поскольку на всем протяжении болезни в группах преобладало снижение адгезивной активности клеток в ответ на действие плазмы. В случае метаболической активности можно предположить, что плазма оказывала преимущественно стимулирующее действие.

Сравнительный анализ действия плазмы пациентов групп А и В на адгезивную и метаболическую активность нейтрофилов доноров показал, что на начальной стадии болезни действие плазмы на адгезивную активность нейтрофилов доноров в группах А1 и В1 достоверно отличается ($p=0,0005$): в группе

Таблица 1

Характер действия плазмы крови пациентов группы А на метаболическую и адгезивную активность нейтрофилов крови доноров (количество проб, увеличивающих клеточную активность / количество проб, уменьшающих клеточную активность из всех образцов по группе)

Группа А1	Группа А2	Группа А3	Группа А4	Группа А в целом
Адгезивная активность				
13/0	6/5	15/0	8/4	42/9
Метаболическая активность				
1/12	4/7	3/12	3/9	11/39

Таблица 2

Характер действия плазмы крови пациентов группы В на метаболическую и адгезивную активность нейтрофилов крови доноров (количество проб, увеличивающих клеточную активность / количество проб, уменьшающих клеточную активность из всех образцов по группе)

Группа В1	Группа В2	Группа В3	Группа В4	Группа В5	Группа В в целом
Адгезивная активность					
4/9	3/6	1/4	5/4	4/9	17/32
Метаболическая активность					
7/6	4/5	5/0	6/3	9/4	30/19

А плазма оказывала исключительно стимулирующее действие на клетки доноров, в группе В выявлены разнонаправленные сдвиги в активности клеток. В случае метаболической активности, плазма пациентов группы А1 приводила преимущественно к снижению метаболической активности клеток доноров, в от время как плазма пациентов группы В1 обладала разнонаправленным действием ($p=0,03$). Далее, в группах А2 и В2 характер действия плазмы как на адгезивную, так и на метаболическую активность не отличался. Характер влияния плазмы кардинально менялся в группах А3 и В3: в группе А плазма оказывала преимущественно стимулирующее, а в группе В преимущественно супрессивное ($p=0,001$) действие на адгезивную активность и противоположный эффект наблюдался в отношении метаболической активности клеток ($p=0,04$). В группах А4 и В4 характер действия плазмы снова не отличался. В целом, можно сказать что на протяжении болезни плазма пациентов группы А обладала преимущественно стимулирующим влиянием на адгезивную активность нейтрофилов доноров по сравнению с

группой В ($p=0,00001$) и преимущественно супрессивным действием в отношении метаболической активности клеток ($p=0,00001$).

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что, несмотря на схожую динамику изменения адгезивной активности нейтрофилов у пациентов с ожогами различной степени тяжести, системная реакция организма, выражающаяся в направлении действия растворимых факторов плазмы на функциональные характеристики нейтрофилов доноров, существенно различается. Выраженное подавляющее влияние плазмы крови пациентов с обширной ожоговой травмой в отношении метаболической активности нейтрофилов доноров, по всей видимости, является результатом включения механизмов, предупреждающих активацию клеток непосредственно в сосудистом русле и снижающих системную продукцию ими активных форм кислорода. При этом стимулирующее действие плазмы относительно адгезивной активности клеток, скорее всего, должно способствовать более эффективной адгезии клеток и их проникновению в очаг воспаления.

Литература

1. Ярилин А.А. Основы иммунологии. Москва: Медицина; 1999, 608с.
2. Кожевников В.С., Киселев С.В., Коненкова Л.П., Крючкова И.В. Метод оценки системной воспалительной реакции. Медицинская иммунология, 2001; т.3, №3:457–460.
3. Bone В.С., Balk R.A., Cerra F.B. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit. Care Med, 1992; vol.20: 864–874.
4. Drost E.M., Kassabian G., Meiselman H.J., Gelmont D., Fisheram T.C. Increased rigidity and priming of polymorphonuclear leukocytes in sepsis. J. Respir. Crit. Care Med, 1999; vol.159:1696–1702.
5. del Pozo M. A., Sfinchez–Mateos P., Nieto M., Stinchez–Madrid F. Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. involvement of cAMP signaling pathway. The Journal of Cell Biology, 1995; vol. 131, № 2:495–508.
6. Киселева Е.П., Полевщиков А.В. Метод автоматизированного учета НСТ–теста. Клиническая лабораторная диагностика, 1994; №4:27–29.
7. Петракова О.В., Гурманчук И.Е. Изучение адгезионной способности нейтрофильных гранулоцитов у больных с ожогами различной степени тяжести. Материалы юбилейной научно–практической конференции, посвященной 40–летию ЦНИЛ и 55–летию СНО ВГМУ. Витебск, 2003, с. 135–138.