

## ОЦЕНКА БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ И СЕКРЕЦИИ ЦИТОКИНОВ ЛЕЙКОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ НА РАННЕЙ СТАДИИ РАЗВИТИЯ ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНИ

© 2010 А.Л. Бурмистрова<sup>1</sup>, Ю.Ю. Филиппова<sup>1</sup>, М.И. Угнивенко<sup>2</sup>, Н.Е. Самышкина<sup>1</sup>,  
И.А. Кочергина<sup>1</sup>, И.А. Скорик<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Челябинский государственный университет  
<sup>2</sup>Городская клиническая больница № 6, Челябинск

Поступила в редакцию 30.09.2010

В работе представлены уровни бактерицидной активности нейтрофилов и секреции некоторых цитокинов интактными и стимулированными *E. coli* нейтрофилами и мононуклеарами периферической крови ожоговых больных на стадии синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) с оценкой динамики состояния больных по клиническим данным, тяжести течения ожоговой болезни, наличия осложнений и исхода. Установлено, что на стадии ССВО, маркерами летального исхода пострадавших, отнесенных к тяжелому сепсису, являются: дисрегуляция бактерицидной активности нейтрофилов (преобладание внеклеточного киллинга живых *E. coli* над внутриклеточным); низкие уровни TNF-а в супернатантах интактных мононуклеаров при 24-часовой инкубации, INF- $\gamma$  – активированных мононуклеаров и IL-10 (вне зависимости от стимуляции) по сравнению практически со всеми группами исследования.

Ключевые слова: ожоги, цитокины, синдром системного воспалительного ответа, сепсис

По данным Всемирной организации здравоохранения термические поражения занимают 3 место среди прочих травм, в России на их долю приходится 10-11%. По длительности и тяжести течения ожоговая болезнь лидирует среди различных травм. Одной из ведущих причин летальных исходов ожоговой болезни является сепсис [2]. Сепсис описан как комплексный клинический синдром, включающий синдром системного воспалительного ответа (ССВО), на фоне которого присоединяется инфекция. Исходом данного синдрома может быть тяжелый сепсис, ассоциированный с органной дисфункцией, и септический шок [3]. Следует отметить, что определенные сложности своевременной постановки диагноза сепсис обусловлены тем, что ССВО, лежащий в основе современной концепции сепсиса, развивается у пострадавших с обширными поражениями кожи уже в ранние периоды ожоговой болезни, когда еще нет клинических признаков инфекционного процесса [4]. При ожоговой травме развитие ССВО связано с громадным поступлением в циркуляцию факторов эндогенной природы (речь, прежде всего, идет о молекулярных сигналах повреждения и гибели клеток –

damage-associated molecular patterns – DAMPs) при отсутствии экзогенных факторов микробного происхождения [5]. В соответствии с принципами гомеостаза эти молекулы должны быть удалены из организма при минимальной выраженности воспалительного процесса или при отсутствии такового, если порог эндогенных антигенов не превышает определенный уровень [5]. Вследствие этого площадь поражения, глубина поражения, орган-мишень будут во многом определять выраженность воспалительного процесса, его характеристики – «время/порядок» и исход. Хорошо известно, что одним из показательных маркеров выраженности воспалительных реакций и функциональной активности клеток врожденного ответа на развитие стресса, является уровень цитокиновой секреции [7]. Первыми клетками, участвующими в этом процессе являются нейтрофилы, для которых характерен немедленный (в т.ч. фагоцитоз) и ранний индуцированный ответ, каждый из которых инициируется через различные рецепторы, но способен сопровождаться секрецией цитокинов [8]). Согласно современным представлениям [6] первыми клетками, вовлеченными в рекрутирование и активацию других эффекторов, в том числе нейтрофилов, являются «ползающие» внутри сосуда (исполняющие функции «иммунных надзирателей») моноциты крови, отвечающие на сигналы стресса продукцией «цитокинов тревоги» – TNF-а, IL-1 и хемокинов. Второй сет ответов моноцитов связан с продукцией и секрецией расширенного ассортимента цитокинов в ходе раннего индуцированного ответа, на фоне менее выраженной, по сравнению с нейтрофилами, фагоцитарной реакции.

Бурмистрова Александра Леонидовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии и иммунологии. E-mail: burmal@csu.ru

Филиппова Юлия Юрьевна, аспирантка. E-mail: filipova\_yulia@mail.ru

Угнивенко Максим Игоревич, заведующий отделением реаниматологии и анестезиологии для ожоговых больных

Самышкина Наталья Евгеньевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии и иммунологии

Кочергина Ирина Александровна, аспирантка

Скорик Игорь Александрович, главный врач

В то же время необходимо отметить, что, несмотря на огромное количество исследований, посвященных изучению этиологии, патогенеза и терапии сепсиса, сепсис и ССВО во многих отношениях остаются загадкой. До настоящего времени не ясно, является ли сверхактивация компонентов врожденной иммунной системы, сопровождающаяся «цитокиновым штормом», ответом на тяжелую микробную инфекцию или на выраженное поражение тканей (термическая травма). Почему одни пациенты умирают на ранних стадиях развития сепсиса в период ССВО (3-10 день), а другие – на поздних стадиях, которые ассоциируются не только с противовоспалительным профилем цитокинов, но и с состоянием «иммунного паралича» нейтрофилов в ассоциации со снижением их апоптоза и ответа на сигналы, регулирующие их поступление в ткани [9].

**Цель исследования** – оценить немедленный (фагоцитоз) и ранний индуцированный (цитокиносекреция) ответы нейтрофилов и мононуклеаров периферической крови на живые клетки *E. coli* в системе *in vitro* пациентов с ожоговой травмой на стадии ССВО с целью определения предикторов прогноза развития ожоговой болезни: сепсис – тяжелый сепсис – септический шок и гибель/выздоровление пациентов.

#### Материалы и методы.

**Характеристика обследованных пациентов.** Обследовано 33 пациента, находившихся на лечении в отделении реанимации областного ожогового центра им. Р.И. Лившица, г. Челябинска с 2007 по 2009 гг. В исследуемую группу вошли 25 мужчин (76%) и 8 женщин (24%). Средний возраст больных составил  $36 \pm 2$  года (от 15 до 61 года). Наиболее частым повреждающим фактором являлось пламя. Все обследованные имели глубокие комбинированные ожоги II-III-IV степени, площадь поражения кожи составляла от 18 до 50% поверхности тела.

Для интегральной оценки тяжести травмы использовали индекс тяжести термического поражения (ИТТП). В исследование были включены пациенты с ИТТП от 30 до 110 условных единиц. Диагноз ССВО, сепсиса, тяжелого сепсиса и септического шока ставился на основании положений Чикагской согласительной конференции (1992). Все пациенты были взяты в исследование на 3-6 дни ожоговой болезни (после периода ожогового шока) – на стадии развития ССВО.

Для решения поставленной цели все больные были разделены на группы по следующим критериям развития у них ожоговой болезни и ее исхода: ССВО – выздоровели, ССВО – сепсис – выздоровели, ССВО – сепсис – тяжелый сепсис – выздоровели/летальный исход, ССВО – септический шок – летальный исход. 1 группа – ССВО – выздоровели, 5 человек; 2 группа – сепсис – выздоровели, 17 человек; 3 группа – тяжелый сепсис – выздоровели, 4 человека; 4 группа – тяжелый сепсис – летальный исход, 2 человека; 5

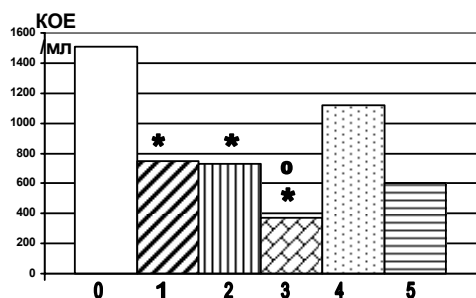
группа – септический шок – летальный исход, 3 человека. В качестве контроля была взята кровь 11 практически здоровых доноров.

**Методы оценки функциональной активности клеток врожденной иммунной системы.** У пострадавших, отнесенных к разным группам (в зависимости от проявлений сепсиса), были определены показатели функциональной активности нейтрофилов и мононуклеаров периферической крови, выделенных на двойном градиенте плотности (фиколл-урографин), отражающие бактерицидную активность в отношении живых клеток *E. coli* и цитокиносекрецию интактных и активированных бактериями нейтрофилов и мононуклеаров. Бактерицидную активность оценивали по выживаемости живых *E. coli* при взаимодействии с нейтрофилами периферической крови *in vitro*, используя метод С. Д. Дугласа и П. Г. Куи [1]. Нейтрофилы выделяли из гепаринизированной периферической крови с использованием двойного градиента ( $\rho = 1,077/1,093$  г/см<sup>3</sup>), выход клеток составил 95%. В качестве объекта фагоцитоза применяли *E. coli* ATCC штамм 25922 (получен из ГИСК им. Л.А. Тарасевича), однодневную культуру, в соотношении: нейтрофил: *E. coli* – 1:10. В качестве контроля была оценена общая выживаемость *E. coli* без взаимодействия с нейтрофилами.

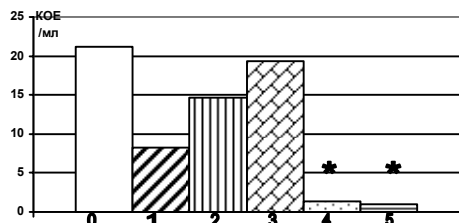
Цитокиносекреция – уровень цитокинов: IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra («Вектор-Бест», Новосибирск) в супернатантах нейтрофилов доноров и ожоговых больных (при стимуляции живыми *E. coli* и без стимуляции) через 2 и 24 часа культивирования определяли методом твердофазного ИФА. Уровень цитокинов: IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra («Вектор-Бест», Новосибирск) и IL-10 («Biosource», USA) в супернатантах интактных и активированных живыми *E. coli* мононуклеаров доноров и ожоговых больных определяли только через 24 часа культивирования. Для оценки статистически значимых различий был проведен многофакторный дисперсионный анализ с использованием пакета прикладных программ «SPSS 18.0». Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

#### Результаты и обсуждение.

**Оценка бактерицидной активности нейтрофилов.** Первый этап работы заключался в исследовании общей и внутриклеточной выживаемости живых *E. coli* при взаимодействии с нейтрофилами ожоговых больных на стадии ССВО в системе *in vitro* (рис. 1). Общую выживаемость живых *E. coli* при взаимодействии с нейтрофилами периферической крови *in vitro* оценивали через 2 часа инкубации. Данные свидетельствуют о наличии высокой активности ответа нейтрофилов ожоговых больных на стадии ССВО, в последующем перешедших в стадию тяжелого сепсиса, но с благоприятным исходом – выздоровление (группа 3).



**Рис. 1.** Общая выживаемость *E.coli* при взаимодействии с нейтрофилами доноров и ожоговых больных *in vitro* ( $\times 10^3$  КОЕ/мл)



**Рис. 2.** Внутриклеточная выживаемость *E.coli* при взаимодействии с нейтрофилами доноров и ожоговых больных *in vitro* ( $\times 10^3$  КОЕ/мл)

*Примечание:* 0 – доноры; 1 – ССВО – выздоровели; 2 – сепсис – выздоровели; 3 – тяжелый сепсис – выздоровели; 4 – тяжелый сепсис – летальный исход; 5 – септический шок – летальный исход; \* – различия между донорами и больными ( $p < 0,5$ ); 0 – различия между больными, выздоровевшими после тяжелого сепсиса и пациентами, выздоровевшими после ССВО, сепсиса и пациентами с тяжелым сепсисом с летальным исходом ( $p < 0,5$ )

Внутриклеточная выживаемость *E. coli* в нейтрофилах периферической крови на стадии ССВО у 1, 2, 3, 4 и 5 групп ожоговых больных достоверно снижена по сравнению с группой доноров (рис. 2). Значимые различия наблюдались только в 4 и 5 группах (т.е. в группах с летальным исходом). Диссонанс данных по внеклеточной и внутриклеточной выживаемости живых *E.coli* в этих группах (соотношение внеклеточ-

ной и внутриклеточной выживаемости) может свидетельствовать о дисрегуляции сигнальных путей трансдукции, вызванных запороговым сигналом стресса, что приводит к детерминации дегрануляции (внеклеточная выживаемость) над процессом фагоцитоза, включая захват и переваривание живых микробных клеток, либо о переходе части фагоцитов – нейтрофилов в толерантное состояние, т.е. к выходу их из сетевой структуры межклеточных взаимодействий, характерной для функционирования врожденной иммунной системы, и об уклонении части нейтрофилов от функций защиты (см. группу 4). Наши данные согласуются с результатами, полученными Шлык И.В. с соавторами [4] о нарушении погложительной способности нейтрофилов и снижении числа нейтрофильных гранулоцитов, содержащих дефензины, у ожоговых больных в стадии сепсиса.

**Секреция цитокинов.** Второй этап работы был связан с оценкой уровня цитокиновой секреции выделенных из периферической крови клеток врожденной иммунной системы – нейтрофилов и мононуклеаров – интактных и активированных живыми *E.coli* через 2 часа культивирования (только нейтрофилы) и 24 часа (для нейтрофилов и мононуклеаров). При оценке уровня цитокинов в супернатантах (2, 24 часа) нейтрофилов интактных и активированных живыми *E.coli* были отмечены большие разбросы значений, не зависимо от состояния исследуемого лица – условно здоровый/ожоговая болезнь (что отмечено в инструкции производителя тест-систем). Данный факт не позволяет обсуждать полученные результаты. Уровни цитокинов в супернатантах мононуклеаров (интактных и активированных живыми *E.coli*), определяли через 24 часа инкубации (табл. 1). Как и при изучении уровня цитокинов в супернатантах культивированных нейтрофилов, при работе с мононуклеарами были установлены большие разбросы показателей (что отмечено в инструкции производителя тест-систем).

**Таблица 1.** Секреция TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  и IL-10 интактными и стимулированными мононуклеарами периферической крови доноров и ожоговых больных

Группы	TNF- $\alpha$ пг/мл (24 часа)		INF- $\gamma$ пг/мл (24 часа)		IL-10 пг/мл (24 часа)	
	МоИ	Мо <i>E.coli</i>	МоИ	Мо <i>E.coli</i>	МоИ	Мо <i>E.coli</i>
доноры	1917 $\pm$ 698,2	3131 $\pm$ 1607	11,85 $\pm$ 5,97	17,54 $\pm$ 3,70	41,77 $\pm$ 25,03	0,01 $\pm$ 0,001
ССВО-выздоровели	2951 $\pm$ 1457	2072 $\pm$ 580,7	13,6 $\pm$ 6,12	9,4 $\pm$ 2,18	48,20 $\pm$ 22,01	7,94 $\pm$ 5,72
сепсис-выздоровели	2115 $\pm$ 722,9	8378 $\pm$ 1898	9,80 $\pm$ 2,35	11,50 $\pm$ 2,09	20,50 $\pm$ 11,99	18,40 $\pm$ 8,68
тяжелый сепсис-выздоровели	3664 $\pm$ 2824	5662 $\pm$ 3312	13,28 $\pm$ 5,75	18,51 $\pm$ 3,31	34,18 $\pm$ 34,01	30,06 $\pm$ 29,17
тяжелый сепсис-летальный исход	160,8 $\pm$ 138,0*	1651 $\pm$ 1243	21,15 $\pm$ 0,19	1,88 $\pm$ 0,85*	1,49 $\pm$ 1,48 <sup>0</sup>	0,21 $\pm$ 0,20 <sup>0</sup>
септический шок-летальный исход	1593 $\pm$ 494,1	4057 $\pm$ 3056	2,87 $\pm$ 1,49	9,03 $\pm$ 5,72	4,35 $\pm$ 3,45	12,22 $\pm$ 12,20

*Примечание:* показатели уровней других цитокинов различий не имели. МоИ – интактные мононуклеары, Мо*E.coli* – мононуклеары, стимулированные живыми *E.coli*; \* – различия между больными, перешедшими в стадию тяжелого сепсиса с летальным исходом и остальными исследуемыми группами ( $p < 0,5$ ); 0 – различия между больными, перешедшими в стадию тяжелого сепсиса с летальным исходом и пациентами групп «ССВО-выздоровели, сепсис-выздоровели» ( $p < 0,5$ )

Тем не менее, обращает внимание факт наличия у больных 4 группы (ССВО – тяжелый сепсис, имеющих в последующем неблагоприятный исход – летальный) достоверно низких уровней TNF-а в супернатантах интактных мононуклеаров и INF- $\gamma$ – активированных мононуклеаров по сравнению со всеми группами исследованных. Кроме того, на стадии ССВО у пострадавших, отнесенных к тяжелому сепсису с летальным исходом (группа 4), наблюдается достоверное снижение уровня IL-10 (вне зависимости от стимуляции) в супернатантах мононуклеаров по сравнению с аналогичными показателями в группах пациентов «ССВО – выздоровели» и «сепсис – выздоровели».

**Выводы:** наиболее информативными иммунологическими маркерами воспаления, которые можно использовать в прогнозе развития и исхода ожоговой болезни на стадии ССВО являются:

1. дисрегуляция бактерицидной активности нейтрофилов: преобладание внеклеточного киллинга живых бактерий *E. coli* над внутриклеточным;
2. низкие уровни цитокинов на стадии ССВО у пострадавших, отнесенных к тяжелому сепсису с летальным исходом: TNF-а в супернатантах интактных мононуклеаров при 24-часовой инкубации, INF- $\gamma$  – активированных мононуклеаров и IL-10 (вне зависимости от стимуляции) по сравнению практически со всеми группами исследования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Дуглас, С.Д. «Исследование фагоцитоза в клинической практике» Пер. с англ. / С.Д. Дуглас, П.Г. Куиг. – М.: Медицина, 1983. С. 92-96.
2. Тарасов, А.Е. Иммунологические аспекты ожоговой болезни в клинике и эксперименте – Автореф. дис. канд. мед. наук. М., 2008. 40 с.
3. Черешнев, В.А. Системное воспаление как иммунопатобиологический феномен / В.А. Черешнев, Е.Ю. Гусев // Цитокины и воспаление. 2002. Т. 1, № 2. С. 17.
4. Шлык, И.В. Ожоговый сепсис: особенности развития и ранней диагностики / И.В. Шлык, Ю.С. Полушин // Вестник анестезиологии и реаниматологии. 2009. Т.6, №5. С.16-24.
5. Bianchi, M. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger // Journal of Leuk. Biol. 2007. V. 81. P. 1-5.
6. Hickey, M. Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels / M. Hickey, P. Kubes // Nature Reviews Immunology. 2009. V. 9. P. 364-375.
7. Hotchkiss, R. The pathophysiology and treatment of sepsis / R. Hotchkiss, I. Karl // The new England journal of Medicine. 2003. V. 9. P. 138-150.
8. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities // Nature Reviews Immunology. 2006. V. 6. P. 173-182.
9. Rittirsch, D. Harmful molecular mechanisms in sepsis / D. Rittirsch, M. Flierl, P. Ward // Nature Reviews Immunology. 2008. V. 8. P. 776-787.

## ESTIMATION OF BACTERICIDAL ACTIVITY AND CYTOKINES SECRETION BY LEUCOCYTES OF THE PERIPHERIC BLOOD AT EARLY STAGE OF DEVELOPMENT OF THE BURN DISEASE

© 2010 A.L. Burmistrova<sup>1</sup>, Yu.Yu. Filippova<sup>1</sup>, M.I. Ugnivenko<sup>2</sup>, N.E. Samyshkina<sup>1</sup>, I.A. Kochergina<sup>1</sup>, I.A. Skorik<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Chelyabinsk State university

<sup>2</sup> City Hospital N6, Chelyabinsk

In work are presented the levels of bactericidal activity of neutrophils and secretion of some intact cytokines and stimulated of *E. coli* by neutrophils and mononuclears of peripheric blood of burn patients at a stage of systemic inflammatory response (SIRS) syndrome with an estimation of dynamics of patients condition on clinical data, gravity of burn disease current, presence of complications and outcome. It is established, that at SIRS stage markers of lethal outcome of the victims, carried to serious sepsis, are: dysregulation of bactericidal activity of neutrophils (prevalence extracellular killing of alive *E. coli* above intracellular); low levels TNF-а in supernatants of intact mononuclears at 24-hour incubation, INF--activated mononuclears and IL-10 (without dependence from stimulation) in comparison practically with all groups of research.

Key words: *burns, cytokines, systemic inflammatory response syndrome, sepsis*

Alexandra Burmistrova, Doctor of Medicine, Professor, Head of the Department of Microbiology and Immunology. E-mail: burmal@csu.ru

Yuliya Filippova, Post-graduate Student. E-mail: filippova\_yulia\_@mail.ru

Maxim Ugnivenko, Chief of Reanimatology and Anesthesiology Unit for Burn Patients

Nataliya Samyshkina, Candidate of Biology, Associate Professor at the Department of Microbiology and Immunology

Irina Kochergina, Post-graduate Student

Igor Skorik, Head Physician