

Білки гострої фази як біомаркери запалення за умов моделювання термічної травми

І.Г. Літовка¹, М.О. Завгородній¹, С. Магомедов², П.К. Цапенко¹, Н.М. Бобок³, Р.В. Янко¹

¹Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;

²ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», Київ;

³ІНСТИТУТУМ АГ, Цуг, Швейцарія; e-mail: litir@biph.kiev.ua

Визначення концентрації білків гострої фази зумовлено їхньою ключовою роллю в каскаді реакцій неспецифічного захисту при термічних травмах. Особливістю більшості цих білків є неспецифічність та висока кореляція концентрації у крові з активністю патологічного процесу. Досліджуючи біохімічні маркери у ранньому післяопіковому періоді нами встановлено, що виражена системна запальна відповідь після термічної травми відбувалася між 3-ю і 9-ю добою. При цьому гаптоглобін і церулоплазмін діють як більш швидкі білки гострої фази. Їх концентрація у сироватці крові щурів зростала та сягала максимальних значень на 3-тню добу після опікової травми, що перетворює їх у результативний маркер для виявлення ранньої запальної реакції та інфекційного ускладнення. Зміни концентрації С-реактивного білка в сироватці крові продемонстрували найвищу кореляцію з активністю інфекційного процесу, що доводить його високу ефективність для виявлення запальних процесів різної важкості, вибору адекватного лікування та прогнозу перебігу захворювання. Отримані результати можуть бути застосовані для визначення запальної реакції та важкості патологічних процесів після термічної травми.

Ключові слова: термічна травма; білки гострої фази; гаптоглобін; церулоплазмін; С-реактивний білок.

ВСТУП

Щорічно у світі від термічної травми вмирає майже 300 тис людей [1]. За останні роки зростання їх чисельності в Україні пов'язано з військовими подіями. Адже відомо, що опіки – поширена травма, яка спостерігається під час бойових дій як серед військових, так і пересічних громадян [2]. Опікова травма викликає складну місцеву та системну запальну реакцію з наступним сепсисом і поліорганною недостатністю [3, 4]. Ці запальні процеси супроводжуються синтезом білків гострої фази, що зумовлено їхньою ключовою роллю в каскаді реакцій неспецифічного захисту при опіковому ушкодженні [5]. Особливістю більшості з них є неспецифічність та висока кореляція концентрації у крові з активністю патологічного процесу. Саме це вигідно

відрізняє їх від таких показників, як швидкість осідання еритроцитів, число лейкоцитів та зсув лейкоцитарної формули [6].

Запальний процес є характерним для більшості опікових ускладнень. Він починається приблизно через 4–8 год після опіку та зберігається протягом тривалого періоду після травми. Під час останньої білки гострої фази, включаючи С-реактивний білок (СРБ), церулоплазмін та гаптоглобін вивільняються в кров, що серед іншого призводить до рекрутування та міграції запальних клітин [7].

У клінічній практиці СРБ розглядається як основний, хоч і неспецифічний маркер запалення, який з'являється в крові у відповідь на будь-яке системне пошкодження тканин організму, викликане інфекцією, запаленням, опіковою травмою. Проте дані щодо його чутливості та специфічності варіюють у різних

публікаціях. На думку деяких дослідників, навіть виявлення незначного підвищення вмісту СРБ у сироватці крові є результативним для моніторингу опікових ускладнень. Окрім того, вимірювання концентрації СРБ повинно проводитися в комплексі з іншими біохімічними показниками для виявлення системної запальної відповіді [8]. Серед них церулоплазмін, який бере участь у гострофазних реакціях, регулює вміст біогенних амінів в організмі, має антиоксидантні властивості [9]. Церулоплазмін є фізіологічним інгібітором ферменту мієлопероксидази нейтрофілів, яким властива потужна бактерицидна активність і генерує кисневі радикали. Він інтенсивно синтезується протягом перших двох днів від початку інфекційного процесу. Його вміст майже подвоюється у відповідь на запалення, травму або інфекцію [10].

Гаптоглобін – це білок гострої фази, синтез і секреція якого посилюється в умовах інфекції або запалення. Він виконує численні функції в організмі та відіграє важливу роль у різноманітних біологічних процесах. Проявляє імунорегуляторні властивості, бере участь в інгібуванні оксиду азоту та ангіогенезі, стимулює відновлення тканин тощо [11]. Нині розглядається як потенційний біомаркер багатьох захворювань, у тому числі при термічних ураженнях, оскільки його концентрація у плазмі змінюється при патології. Він стимулюється медіаторами запалення, при цьому пік підвищення спостерігається на 4–6-ту добу, а нормалізується протягом 2 тиж після видалення стимулювальних факторів [12]. Гострофазова реакція на порушення гомеостазу породжує каскад змін регуляції транскрипції, що призводить до збільшення синтезу одних білків і зниження інших [13].

Наразі немає єдиної думки щодо того, який саме біохімічний маркер найбільш надійний для відстеження рівня запалення та/або інфекції при термічній травмі. Тому дослідження моніторингу вмісту білків гострої фази СРБ, церулоплазміну і гаптоглобіну для визначення найефективніших із них

при термічному ураженні є актуальними для виявлення ранніх запальних та інфекційних ускладнень і стратегії для їх усунення.

Метою нашого дослідження було визначення вмісту білків гострої фази (СРБ, гаптоглобін, церулоплазмін) у ранньому післяопіковому періоді для діагностики та прогнозування запальної реакції після термічної травми.

МЕТОДИКА

Дослідження здійснено на 40 щурах-самцях лінії Вістар, вік яких на початку експерименту становив 3 міс. Всі тварини знаходилися під наглядом ветеринарного лікаря при природному циклі світ/темрява з вільним доступом до води у стандартних умовах акредитованого віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України із дотриманням загальних принципів біоетики (протокол № 3-23 від 11.01.23) відповідно до міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Тварин було розподілено на 4 групи: I – контрольна, II, III, IV – щури з моделюваною термічною травмою, яких виводили з експерименту через 3, 9 та 14 днів відповідно від її нанесення.

Дослідним щурам під кетаміновою анестезією наносили опіки на заздалегідь підготовлену ділянку шкіри (шкіра спини в ділянці лопаток, у проекції нижньої частини лопатки, відступаючи близько 1 см від хребта) за допомогою скляної пробірки з плоским дном, що містила окріп. Для створення опіків на всю товщу шкірного покриву з мінімальним ураженням підшкірних структур емпірично було підібрано 15-секундну експозицію прикладання пробірки. Дно пробірки мало діаметр 1,8 см, що відповідає площі 2,54 см². Крім того, пробірка містила вантаж і мала загальну масу 140 г.

Температуру води в пробірці доводили до 100°C, нагріваючи її на водяній бані. При

нанесенні опіку пробірку утримували за допомогою анатомічного затискувача, виймали з водяної бані та швидко обсушивши фільтрувальним папером дно, ставили його на шкіру щура під власною вагою. При цьому візуально контролювали, щоб забезпечувався повний контакт шкіри з усією поверхнею дна пробірки. Час експозиції становив 15 с. Завдяки використанню вантажу пробірки з водою на шкіру створюється тиск однакової сили та забезпечується теплоємність конструкції, що в сукупності дає змогу одержати опіки III ступеня. Для дослідження змін концентрації білків гострої фази (СРБ, гаптоглобін, церулоплазмін) за умов моделювання термічної травми щурів виводили з експерименту на 3, 9 і 14-ту добу. У сироватці крові визначали концентрацію СРБ, гаптоглобіну, церулоплазміну на біохімічному аналізаторі Cobas 311 з використанням тест систем Roche Diagnostics.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали з використанням пакета програми Origin Pro 8,5. Визначали середні значення отриманих показників (М) зі стандартними відхиленнями (SD). Достовірність різниці між групами з нормальним розподілом порівняння оцінювали за критерієм t Стюдента. При $P < 0,05$ зміни вважали достовірними. Для визначення статистичної значущості відмінностей між групами для кількісних (із розподілом, відмінним від нормального) і порядкових змінних був використаний критерій Кроскела—Уоліса. Порівняння кількісних і порядкових змінних у залежних вибірках проводили за допомогою критерію Вілкоксона. Результати на графіках представлено у вигляді медіани і перцентилей.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Концентрація СРБ, що є одним із найчутливіших маркерів запалення, стрімко зростала у сироватці крові щурів на різних стадіях опікової хвороби, починаючи з 3-ї доби спостереження. Максимуму вона сягала на

9-ту добу, коли вміст збільшився на 235,3% порівняно з контролем ($P < 0,05$; рис. 1). Цей показник залишався високим і на 14-ту добу. Проте він був на 38,6% вірогідно нижчим за попередні значення і не відрізнявся від вимірювань на 3-тю добу.

Максимальну концентрацію церулоплазміну спостерігали на 3-тю добу від початку експерименту. Вона була вищою за контрольні значення на 41,4% ($P < 0,05$; рис. 2). Протягом 9–14-ї доби відбувалося її поступове зниження на 23,1 і 38,8% відповідно ($P < 0,05$) порівняно з максимальним значенням. При цьому вміст церулоплазміну на 14-ту добу дослідження був вірогідно нижчим на 20,4% ($P < 0,05$) навіть відносно контролю.

Подібно змінювалася і концентрація гаптоглобіну. Її максимальне підвищення порівняно з контролем на 29,0% ($P < 0,05$; рис. 3) відбулося на 3-тю добу експерименту. Однак на 9-ту добу концентрація гаптоглобіну була нижчою відносно контролю і максимального значення на 3-тю добу на 29,3 і 45,2% відповідно ($P < 0,05$). На 14-ту добу вміст гаптоглобіну в сироватці крові зріс на 41,4% ($P < 0,05$) відносно рівня на 9-ту добу і повернувся до контрольних значень.

Вважаємо, що в проміжок часу між 3-ю і 9-ю добою відбувалася виражена системна

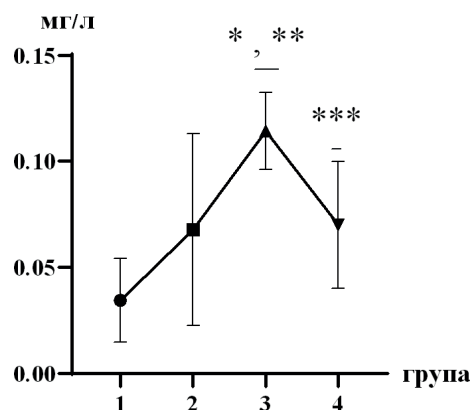


Рис. 1. Концентрація С-реактивного білка в контрольній групі (1) та через 3 доби (2), 9 діб (3) і 14 діб (4) після опікової травми. * $P < 0,05$ відносно контролю; ** $P < 0,05$ відносно значень на 3-тю добу; *** $P < 0,05$ відносно значень на 9-у добу

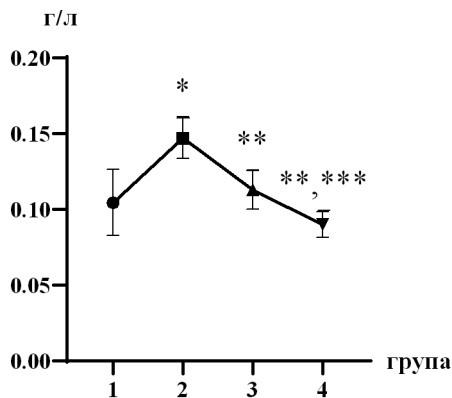


Рис. 2. Концентрація церулоплазміну в контрольній групі (1) та через 3 доби (2), 9 діб (3) і 14 діб (4) після опікової травми. * $P < 0,05$ відносно контролю; ** $P < 0,05$ відносно значень на 3-тю добу; *** $P < 0,05$ відносно значень на 9-у добу

запальна відповідь. При цьому у щурів з опіковою травмою висока концентрація СРБ у сироватці крові зберігалася довше, ніж решта вимірюваних показників. Це збігається з даними дослідників, які спостерігали високу концентрацію СРБ у пацієнтів із сильними опіками протягом усього періоду перебування у відділенні інтенсивної терапії [14]. Автори вважають, що навіть незначне підвищення вмісту СРБ у сироватці крові можна використовувати не лише для прогнозування смертності від опіків, але й для моніторингу відповіді пацієнтів на протокол

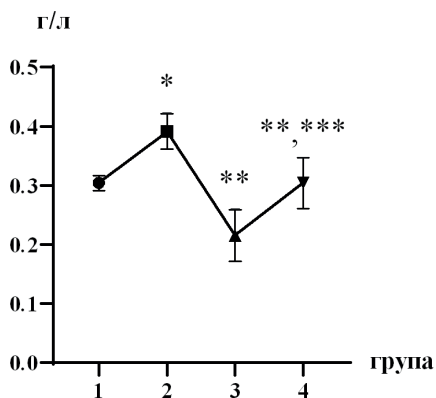


Рис. 3. Концентрація гаптоглобіну в контрольній групі (1) та через 3 доби (2), 9 діб (3) і 14 діб (4) після опікової травми. * $P < 0,05$ відносно контролю; ** $P < 0,05$ відносно значень на 3-тю добу; *** $P < 0,05$ відносно значень на 9-у добу

лікування або для прийняття рішення про необхідність зміни плану лікування. Тобто не лише абсолютне значення на 1-й день опікової травми, але й тенденція також є важливою для прогнозування при опіках. З'являється все більше доказів того, що СРБ являє собою не тільки маркер запалення, але й відіграє активну функціональну роль і є важливим регулятором у запальному процесі [15]. Зокрема, він асоціюється із системним запаленням, оскільки зв'язується з пошкодженими клітинними мембранами та сприяє запальній відповіді [16]. СРБ можна використовувати для прогнозування тяжкості запального процесу при опіках.

Водночас гаптоглобін і церулоплазмін діють як більш швидкі білки гострої фази. При вивченні їхніх концентрацій у сироватці крові щурів у динаміці спостерігалось підвищення та досягнення максимальних значень на 3-тю добу після опікової травми. Протягом 9–14 діб ці показники поступово знижувалися і наближалися до контрольних значень. Отримані результати збігаються з даними інших авторів, які під час запалення спостерігали зростання концентрації гаптоглобіну в перші 3 доби від отримання опікової травми. Припускають, що подальше зниження рівня експресії гаптоглобіну пов'язане з можливими мутаціями [12]. Проте є дані, що концентрація церулоплазміну у пацієнтів з опіковою травмою була значно нижчою за референтні значення в 1-шу добу [17]. Такі розбіжності можуть бути пов'язані з дизайном дослідження, розміром вибірки, статі, віком, а також методами і аналізах, які використовували різні групи. Вважаємо, що розуміння кінетики біомаркерів має важливе значення, оскільки патофізіологічні процеси безперервно змінюються, і відстрочена динаміка може призвести до відстрочених клінічних рішень. Тому вкрай важливо ефективно контролювати запалення після опіків, щоб оптимізувати переваги, які воно надає. При цьому одночасно активно запобігаючи ускладненням запалення, включа-

ючи синдром системної запальної відповіді, поліорганну недостатність, розвиток рубців і фіброзу. Вважаємо, що визначення концентрації білків гострої фази відображає рівень запалення та відповідь організму на нього, що перетворює їх на результативний маркер для виявлення ранньої запальної реакції та інфекційного ускладнення. Тому ці біомаркери можуть бути інструментами діагностики прогресування захворювання як на доклінічних, так і в клінічних дослідженнях. Основною метою яких є встановлення діагнозу, стадії захворювання та прогнозування клінічного результату. Одержані результати підкреслюють важливість визначення біомаркерів запалення для оцінки та розуміння запального процесу.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

I.G. Litovka¹, M.O. Zavgorodniy¹, S. Magomedov², P.K. Tsapenko¹, N.M. Bobok³, R.V. Yanko¹

ACUTE PHASE PROTEINS AS BIOMARKERS OF INFLAMMATION UNDER THERMAL INJURY MODELING CONDITIONS

¹ O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv;

² SU "Institute of Traumatology and Orthopedics, NAMS of Ukraine", Kyiv;

³ INSTITUM AG, Zug, Switzerland; e-mail: litir@biph.kiev.ua

Determination of the concentration of acute phase proteins (AFPs) is due to their key role in the cascade of nonspecific defense reactions in thermal injuries. A feature of most AFPs is nonspecificity and high correlation of blood concentration with the activity of the pathological process. Studying biochemical markers in the early post-burn period, it was found that a pronounced systemic inflammatory response after thermal injury occurred between the 3rd and 9th day. At the same time, haptoglobin and ceruloplasmin act as faster acute phase proteins. The concentration of these proteins in the blood serum of rats increased and reached maximum values on the 3rd day after burn injury, which makes them an effective marker for detecting early inflammatory reactions and infectious complications. The dynamics of changes in the

level of C-reactive protein in the blood serum demonstrated the highest correlation with the activity of the infectious process, which proves its high efficiency for detecting inflammatory processes of varying severity, choosing adequate treatment and predicting the course of the disease. The results obtained can be used to determine the inflammatory reaction and severity of pathological processes after thermal injury.

Key words: thermal injury; acute phase proteins; haptoglobin; ceruloplasmin; C-reactive protein.

REFERENCES

1. Wang T, Nie C, Zhang H, Zeng XQ, Yu HT, Shi SP, Wei ZR, Shi XQ. Epidemiological characteristics and disease burden of burns in children in Northern Guizhou, China. Chin Med J (Engl). 2018; 131(17): 2125-7. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.239312>.
2. Qian L-W, Fourcaudot AB, Chen P, Brandenburg KS, Weaver AJ, Jr, Leung K P. Cerium nitrate enhances antibacterial effects and imparts anti-inflammatory properties to silver dressings in a rat scald burn model. Int J Burns Trauma. 2020; 10(4): 91-100.
3. Burgess M, Valdera F, Varon D, Kankuri E, Nuutila K. The immune and regenerative response to burn injury. Cells. 2022; 11(19): 3073-79. doi:10.3390/cells11193073.
4. Korkmaz H I , Flokstra G, Waasdorp M, Pijpe A, Papendorp SG, de Jong E, Rustemeyer T, Gibbs S, van Zuijlen PPM. The complexity of the post-burn immune response: An overview of the associated local and systemic complications. Cells. 2023;12(3):345-54. doi:10.3390/cells12030345.
5. Lüthje FL, Blirup-Plum SA, Möller NS, Heegaard PMH, Jensen HE, Kirketerp-Møller K, et al. The host response to bacterial bone infection involves a local upregulation of several acute phase proteins. Immunobiology. 2020;225(3):151914. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.151914>.
6. Kovalenko A M, Osadchaya O I, Kovalenko A O, Grisha A S, Linnyk A M, Belynskaya N G. Peculiarities of treatment of sepsis in patients with burn disease. Perioperat Med (Perioperative Medicine). 2020; 3(1):14-20 DOI: 0.31636/prmd.v3i1.3.
7. Korkmaz I, Krijnen PAJ, Ulrich MMW, de Jong E, van Zuijlen PPM, Niessen HWM. The role of complement in the acute phase response after burns. Burns. 2017;43(7): 1390-9. DOI: 10.1016/j.burns.2017.03.007.
8. Li Q, Gong X. Clinical significance of the detection of procalcitonin and C-reactive protein in the intensive care unit. Exp Ther Med. 2018;15(05):4265-70. doi: 10.3892/etm.2018.5960.
9. Vashchenko V, Vashchenko T. Biology and pharmacology of ceruloplasmin: from experiments to drug therapy. Rev Clin Pharmacol Drug Therap. 2008; 6(1): 31-44.
10. Kallenberg C. Antineutrophil antibodies with specificity for myeloperoxidase. Y. Shoenfeld, M. E. Gershwin, P. L. Meroni. Autoantibodies (Eds.), Elsevier, Oxford,

- UK, 2nd ed. 2007. doi:<https://doi.org/10.1016/b978-044452763-9/50017-2>.
11. Kaszak I, Witkowska-Piłaszewicz O, Dolka I, Jurka P. Relationships between haptoglobin and inter-alpha trypsin inhibitor heavy chain 4 levels in local and peripheral blood and systemic inflammatory response syndrome in bitches with pyometra. *Acta Vet Hung.* 2023;71(3-4):174-82. doi: 10.1556/004.2023.00852.
 12. Andersen CBF, Stødkilde K, Sæderup KL, Kuhlee A, Raunser S, Graver sen JH, Moestrup SK. Haptoglobin. *Antioxid Redox Sign.* 2017; 26:814-31. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6793>.
 13. Nirala NR, Shtenberg G. Gold nanoparticle size-dependent enhanced chemiluminescence for ultra-sensitive haptoglobin biomarker detection. *Biomolecules.* 2019;9:12-9. doi: 10.3390/biom9080372.
 14. Sinha A, Sharma MK, Tripathi K, Duggal N, Tiwari VK. Evaluation of serum levels of procalcitonin and C-reactive protein as prognostic indicators in burns. *Ind J Plast Surg.* 2021; 54(3): 308-13. doi:10.1055/s-0041-1734574.
 15. Nourigheimasi S, Yazdani E, Ghaedi A, Khanzadeh M, Lucke-Wold B, Dioso E, Bazrgar A, Ebadi M, Khanzadeh S. Association of inflammatory biomarkers with overall survival in burn patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Emerg Med.* 2024;24(1):76-84. doi: 10.1186/s12873-024-00988-x.
 16. Eschborn S, Weitkamp JH. Procalcitonin versus C-reactive protein: review of kinetics and performance for diagnosis of neonatal sepsis. *J Perinatol.* 2019;39(7):893-903. doi: 10.1038/s41372-019-0363-4.
 17. Klimova OM, Kravtsov OV, Drozdova LA, Kurbanov TA, Hopko AO. Determination of the dynamics of adaptive immunity indicators in the treatment of severely burned patients. *Int Med J.* 2022; 1:25-8.

*Матеріал надійшов
до редакції 05.12.2024*