

АКТИВНОСТ МИЈЕЛОПЕРОКСИДАЗЕ У СЕРУМУ И ЛИВОРУ ПАЦИЈЕНАТА СА ПУРУЛЕНТНИМ МЕНИНГИТИСОМ

Мирић Д.¹, Катанић Р.², Божовић Б.¹, Драгојевић И.¹

¹Институт за биохемију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

²Клиника за инфективне болести, КБЦ Приштина, Грачаница

MYELOPEROXIDASE ACTIVITY IN SERUM AND CEREBROSPINAL FLUID OF PATIENTS WITH PURULENT MENINGITIS

Мирић Д.¹, Катанић Р.², Божовић Б.¹, Драгојевић И.¹

¹Institute of Biochemistry, Medical faculty, Pristina, Kosovska Mitrovica

²Clinic for Infective Diseases, Clinical Center Pristina, Gracanica

SUMMARY

Myeloperoxidase (MPO), a heme enzyme present in the primary granules of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) participate in oxygen-dependent microbicidal activity of these cells. During the course of bacterial meningitis plenty of PMNs leave blood vessels and migrate to cerebrospinal fluid (CSF) space, and some of their MPO may become extracellular. MPO activity in control CSF is low (Me = 0.5 U/L), comparing with patients' CSF samples of all three groups of proteinorrachia where elevated values were found already on admission (3.5 U/L, 5.0 U/L and 12.0 U/L, respectively), with highest values found during second lumbar puncture (5.5 U/L, 7.5 U/L and 14.0 U/L, respectively). Poor correlation was found between albumin quotient and MPO activity CSF/serum, but significant correlation between MPO in CSF and CSF PMNs count.

Key words: Myeloperoxidase, Meningitis, Polymorphonuclears, Blood-brain barrier.

САЖЕТАК

Мијелопероксидаза (МПО) је хем ензим присутан у примарним гранулама полиморфноуклеарних леукоцита (ПМН) и учествује у кисеоник-зависном микробицидном дејству ових ћелија. За време бактеријског менингитиса већи број ПМН напушта крвне судове и доспева у ликворски простор у коме се може детектовати извесна екстрацелуларна МПО активност. Активност МПО у контролној групи ликвора је ниска (Me=0.5 U/L). За разлику од тога, активност МПО у ликвору пацијената је, без обзира на актуелну протеинорахију висока већ при првој пункцији на пријему (3.5 U/L, 5.0 U/L, односно 12.0 U/L) а највише МПО активности у ликвору нађене су при другој пункцији (5.5 U/L, 7.5 U/L, односно 14.0 U/L). Коефицијент корелације албуминског коефицијента и МПО активности ликвор/серум није био статистички значајан, за разлику од значајног коефицијента корелације између активности МПО и броја ПМН у ликвору.

Кључне речи: Мијелопероксидаза, Менингитис, Олиморфноуклеари, Крвно-мождана баријера

УВОД

Неспецифични бактеријски менингитис је комплексан патофизиолошки догађај који и поред савремене и благовремене терапије и данас има често неизван клинички исход. У овом процесу полиморфноуклеарни леукоцити (PNM) и друге фагоцитне ћелије улазе у субарахноидни простор у коме се мање или више успешно сукобљавају са инфективним агенсом. За време фагоцитозе у PNM се многоструко интензивира метаболизам глукозе и кисеоника. У серији узастопних једноелектронских трансфера кисеоник се редукује до супероксид ањона и водоник пероксида (1). Бактерицидну активност водоник пероксида појачава дејство ензима мијелопероксидаза (МПО) која чини чак 5% масе хуманих PNM (2,3). Овај ензим катализује оксидацију

халогених елемената водоник пероксидом створеним у NADPH оксидазној реакцији, до хипохалогених киселина. У реакцији настаје углавном хипохлорна киселина, с обзиром да је хлор доминантан халогени елемент у ћелијама и телесним течностима.

Мијелопероксидаза је ензим који делује у фагоцитима полиморфноуклеара. Међутим, може доћи до његовог ослобађања у простор ван PNM-а, где такође катализује настајак хипохалогених киселина и N-хлорамина који у садејству са другим агенсима нпр. еластазом и протеазама (4) оштећује тесне везе ендотелних ћелија крвно-мождане и епителних ћелија крвно-ликворске баријере, доводећи до дисфункције ових баријера.

Бактерије изазивачи менингитиса колонизују менинге након инвазије на структуре респираторног или гастроинтестиналног епитела због чега PNM-и активисани цитокинима и другим медијаторима инфламације већ у првим сатима развоја менингитиса искажују појачану активност МРО. Постоје докази о повишеној активности МРО у ликвору у случају експерименталне неуротрауме (5), апоплексије (6) и менингитиса (7). Узимајући, међутим, у обзир да инфламаторни процес на менингами компромитује улогу крвно-ликворске и крвно-мождане баријере да делују као макромолекулско сито, циљ овог рада је да одредимо да ли повишене активности МРО ликвора у случају менингитиса представљају заправо активности серумске МРО или фагоцитних ћелија које су миграцијом доспеле у субарахноидни простор.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

За одређивање активности МРО у серуму и ликвору пацијената са неспецифичним бактеријским менингитисом (N=93) коришћени су узорци крви узете венепункцијом без антикоагуланса и узорци ликвора добијени лумбалном пункцијом. Узорци су узимани на пријему (Nr I), затим трећег (Nr II), седмог (Nr III) и двадест првог (Nr IV) дана хоспитализације. Контролна група серума и ликвора (NKO = 54) формирана је узимањем узорка особа пунктираних због менингитиса, односно главобоље услед мускуларне тензије, са нормалним бројем ћелијских елемената и другим налазима у ликвору и серуму у оквиру референтних вредности. С обзиром да је пурулентни менингитис драматично и озбиљно обољење пацијентима се одмах по пријему администрирају антибиотици, антидемагозна и друга терапијска средства. Да би се указало на степен дисфункције можданих баријера, сви су пацијенти, на основу протеинорахије на пријему, разврстани на 3 групе: 1. група, са протеинорахијом до 0.50 g/L (умерено оштећење); 2. група, са протеинорахијом 0.51-1.00 g/L (средње тешко оштећење) и 3. група са протеинорахијом већом од 1.01 g/L (тешко оштећење баријера).

Број и врста ћелијских елемената у ликвору и серуму одређивана је одмах након пункције. Сви узорци предвиђени за биохемијске анализе су центрифуговани 30 минута након узимања, а затим анализирани у року од 2 сата од узимања материјала.

Концентрација укупних протеина у ликвору одређивана је методом по Lowry-у (8,9), са хуманим албумином конц. 1.0 g/L као стандардом. Албумин у серуму и ликвору је одређиван методом ласерске нефелометрије (10) са комерцијалним зечијим LN-антисерумом против хуманог албумина. Албумински коефицијент је израчунаван по методи Reiber-a (11). Каталитичка активност МРО у узорцима одређивана је у систему 4-аминоантипирин/фенол Триндеровом кинетичком реакцијом (12) у присуству натријум азида у финалној концентрацији 1.2 mM/L за блокирање пероксидазне реакције каталазе. Као супстрат коришћен је 1.7 mM/L раствор водоник пероксида. Активност МРО изражава се у U/L на основу моларног апсорпционог коефицијента хинонимина од $1.3 \times 10^4 \text{ L} \times \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

За статистичку евалуацију добијених резултата коришћене су методе параметријске и непараметријске статистике.

РЕЗУЛТАТИ

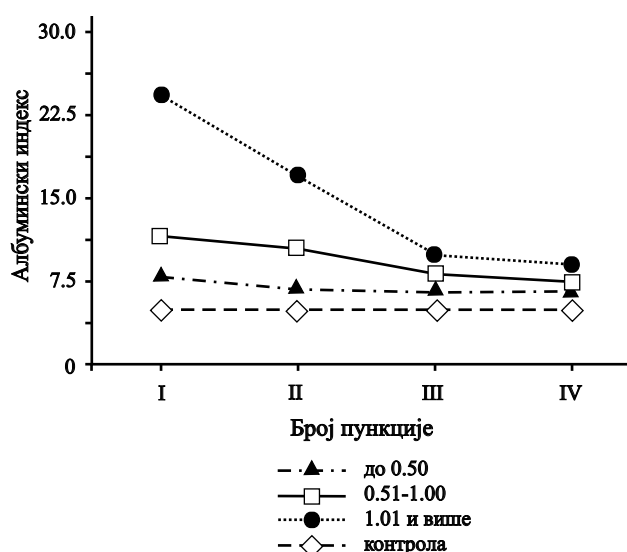
Наши резултати показују да је неспецифични бактеријски менингитис праћен повећаним албуминским коефицијентом (Графикон 1.). Овај је коефицијент статистички значајно већи у односу на контролну групу већ код протеинорахије до 0.50 g/L, чиме јасно указује на губитак способности можданих баријера да дозволе прилив макромолекула у субарахноидни простор, односно да делују као макромолекулско сито.

Табела 1. - Промена броја леукоцита у крви и ликвору пацијената са менингитисом за време хоспитализације.

Пункција број	Леукоцити - крв		Ћелијски ел. у ликвору	
	$\times 10^9 / \text{L}$	%PMN	изнад 3000	%PMN
I	16.7	78	изнад 3000	97
II	9.4	75	894	71
III	8.1	70	97	46
IV	7.6	62	11	0

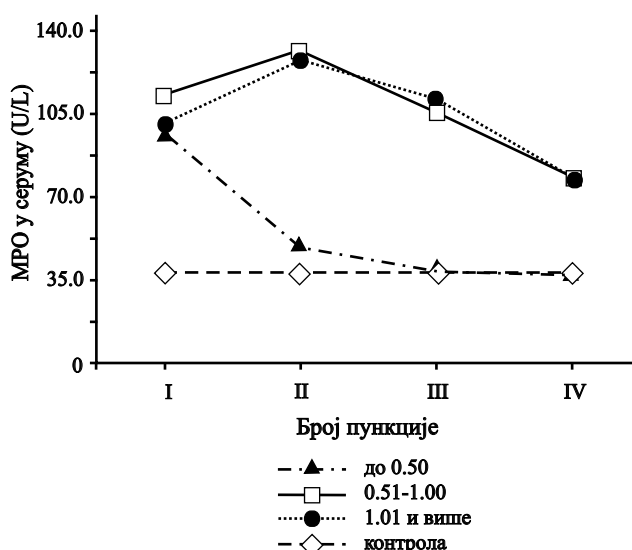
У току пурулентног менингитиса долази до повећања апсолутног броја леукоцита у циркулацији са доминацијом полиморфонуклеара, као део реакције на бактерије изазиваче болести. Истовремено са развојем инфламације менинга фагоцитне ћелије, а посебно полиморфонуклеари, мигрирају у субарахноидни простор (Табела 1).

Леукоцитоза са доминацијом ПМН је део природног, премда не и нарочито софистицираног, одбрамбеног механизма од бактеријских изазивача болести. Полиморфонуклеари су активисани цитокинима и другим хемијским сигнаlima због чега стварају веће коли-



Графикон 1. - Динамика промене албуминског индекса ($\times 10^3$) у функцији протеинорахије на пријему.

чине мијелопероксидазе. Известан број молекула МПО излази из фагоцита у васкуларни простор. На ово указују и наши резултати. Каталитичка активност МПО у серуму пацијената са пурулентним менингитисом (Графикон 2) је већ при првој пункцији била троструко већа од просечне активности контролне групе (99.3 U/L; 112.3 U/L; 101.9 U/L у групама различите почетне протеинорахије, у односу на 37.1 U/L у контролној групи; $p < 0.001$).

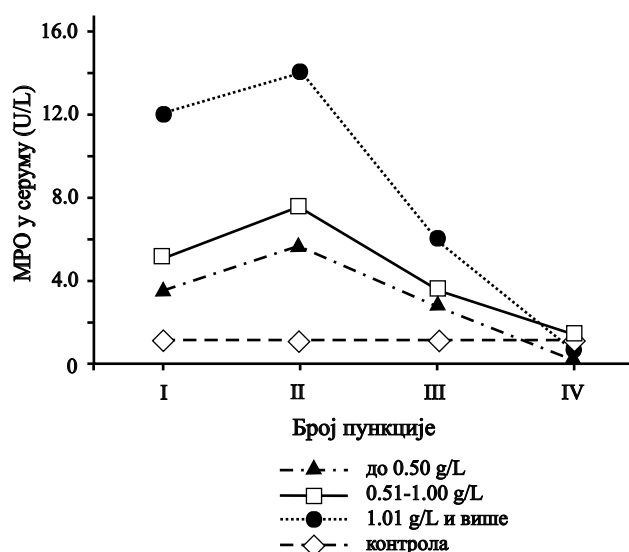


Графикон 2. - Динамика промене активности мијелопероксидазе у серуму (U/L) пацијената са пурулентним менингитисом у функцији протеинорахије.

У серуму пацијената са умереним оштећењем хемато-ликворске баријере активност МПО се константно снижава у току хоспитализације (99.3 U/L; 69.5 U/L; 39.8 U/L и 38.4 U/L). Крајем прве недеље хоспитализације код ових пацијената просечне вредности активности МПО у серуму се не разликују статистички значајно од вредности контролне групе ($p > 0.50$). У случајевима када инфламаторни процес доведе до средње тешког или тешког оштећења хемато-ликворске баријере активност МПО у серуму има другачију динамику промене у току хоспитализације. Код ових пацијената активност МПО у серуму је на пријему статистички значајно већа од контролне групе (112.3 U/L одн. 101.2 U/L према 37.1 U/L контроле; $p < 0.001$), али се у односу на вредности на пријему у групи са умереним оштећењем хемато-ликворске баријере не разликује значајно (112.3 U/L одн. 101.2 U/L према 99.3 U/L; $p > 0.10$).

За разлику од пацијената са умереним оштећењем хемато-ликворске баријере, код испитаника са средње тешким и тешким оштећењем су у време друге пункције (3. дан хоспитализације) у серуму регистроване највеће активности овог ензима (130.5 U/L и 125.7 U/L). У току хоспитализације активност МПО у серуму се и код ове две групе пацијената постепено снижавала, премда је и у време опуста била статистички значајно већа од вредности контролне групе (77.0 U/L, односно 76.5 U/L, према 37.1 U/L контроле; $p < 0.05$).

Каталитичка активност МПО у ликвору контролне групе је изузетно ниска ($Me = 0.5$ U/L) и често се Триндеровом реакцијом није могла измерити никаква активност. Међутим, у ликвору пацијената са пурулентним менингитисом је у свим случајевима било могуће детектовати производ Триндерове реакције. Код ових пацијената су већ на пријему, без обзира на почетне вредности протеинорахије, нађене статистички значајно веће активности МПО у ликвору у односу на контролну групу ($Me = 3.5$ U/L, затим 5.0 U/L и 12.0 U/L према 0.5 U/L контроле; $p < 0.01$). Највеће активности овог ензима на пријему нађене су у групи са протеинорахијом већом од 1.01 g/L (Графикон 3).



Графикон 3. - Динамика промене активности мијелопероксидазе у ликвору пацијената са пурулентним менингитисом у функцији протеинорахије.

Највеће активности МПО у ликвору нађене су у време друге пункције код пацијената 2. и 3. групе протеинорахије. У исто време, међутим, и код ових група, долази до пада вредности албуминског индекса (Слика 1), односно долази до постепеног успостављања интегритета баријера за макромолекуле, уз истовремени скок активности мијелопероксидазе у серуму (Слика 2). Инфламаторни процес мења способност можданих баријера да спречавају дифузију макромолекула у суб-арахноидни простор. Међутим, корелационом анализом смо утврдили да однос албуминског коефицијента и активности МПО ликвор/серум није статистички значајан ($R = +0.139$; $p > 0.05$).

Мијелопероксидаза је ензим који потиче из азурофилних гранула полиморфонуклеара. Из тог разлога смо тестирали повезаност активности овог ензима са апсолутним бројем полиморфонуклеара у серуму односно крви и цереброспиналном ликвору. Нађена вредност коефицијента ранг корелације активности МПО у ликвору и броја ликворских ПМН је статистички значајна ($R = +0.483$; $p < 0.01$), као и вредност коефицијента линеарне корелације активности МПО у серуму и броја ПМН у периферној крви ($R = +0.326$; $p < 0.05$).

ДИСКУСИЈА

Присуство полиморфонуклеарних леукоцита у ликвору пацијената са пурулентним менингитисом је једна од карактеристика ране фазе инфламаторног одговора. Њихово присуство у ликвору указује на централну улогу ПМН у одбрани од бактерија које врше инвазију субарахноидног простора. Ове ћелије, међутим, имају веома малу способност да разликују стране од сопствених антигена. Чак и када дођу у субарахноидни простор брзина њихове деобе и умножавања је ограничена (13), тако да је још увек нејасно да ли ПМН у ликвору могу уопште да помогну у контроли инфекције менинга (14). Медијаторима инфламације активисани ПМН способни су да продукују значајне количине МПО која затим активише еластазу и колагеназе а инхибише $\alpha 1$ -антипротеиназе (15). Упркос напретку у антимикробној терапији бактеријски менингитис има високу смртност (16) и оставља значајне неуролошке и неуролошке секвеле код преживелих (17).

Развој кортикалне исхемије, едема и хеморагије због оштећења микроваскулатуре приписује се матриксним металопротеиназама (16). Студије на животињском моделу су указале да је матриксна металопротеиназа 9 (ММП-9) медијатор у оштећењу мозга у току бактеријског менингитиса (18) а да је код деце присуство ММП-9 у ликвору фактор ризика за неповољан исход болести (19). У физиолошким условима резидентнијални макрофаги можданог ткива и ендотелне ћелије стварају конститутивно мале количине ових протеаза које су неактивне изузев ММП-2. Инфламаторни процес доводи до њихове активације и индукује синтезу ММП-аза (20). Активисане ММП-азе, а нарочито ММП-9, врше опсежну деградацију базалне ламине крвно-мождане баријере и доводе до њене дисрупције. У активацији ММП-аза значајна улога припада реактивним метаболитима кисеоника (21), посебно хипохлорној киселини за чије је стварање потербно дејство МПО.

Наши резултати показују да у току пурулентног менингитиса постоји висока активност МПО у ликвору, односно да је ензим присутан екстрацелуларно. Подаци из литературе у вези могућности проласка молекула МПО из серума кроз оштећену крвно-мождану баријеру су оскудни. Висока активност МПО у серуму пре настанка менингеалне локализације могла би да буде оксидачки сигнал за активацију ММП-аза ендотелних ћелија крвно-мождане баријере, иза чега следи деградација базалне ламине, појачан пролаз макромолекула и улазак ПМН у субарахноидни простор. На овакав редослед догађаја упућују вредности ниског коефицијента корелације албуминског индекса и односа активности МПО ликвор/серум добијен у нашем раду. Када уђу у субарахноидни простор ПМН и даље исказују високу продукцију МПО на шта указује висок коефицијент корелације броја ПМН и активности МПО у ликвору наших пацијената. Хипохлорна киселина генерисана у систему МПО/хлор у субарахноидном простору могла би да активише ММП-азе микроглије и астроцита или инактивира физиолошки инхибитор ММП-аза и интензивира оштећења хемато-ликворске, односно крвно-мождане баријере.

ЛИТЕРАТУРА

- Rosen H., Klebanoff SJ.: Bactericidal activity of superoxide anion generating system: A model for the polymorphonuclear leukocyte. *J Exp Med* 1979; 149; 27-36.
- Klebanoff SJ.: Myeloperoxidase: Contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. *Science* 1970; 169; 1095-99.
- Nauseef WM., Metclaf JA. and Root RK.: Role of Myeloperoxidase in the Respiratory Burst of Human Neutrophils. *Blood* 1983; 61 (3): 483-488.
- Weiss SJ., Peppin G., et al.: Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. *Science* 1985; 222; 625-628.
- Clark RS., Carlos TM., Schiding JK., et al: Antibodies against Mac-1 attenuate neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 1996; 13 (6); 333-341.
- Dzandzava TG. i Sakarasvili RR.: Aktivnost fermentov antioksidativnoј zastiti i soderzhanie produktov perokisnogo oksidationa lipidov v sivorotke krvi i cerebrospinalnoj zidkosti bolnih ishemickeј bolezni mozga. *Vopr Med Himii* 1992; 38 (2); 33-35.
- Filatova TG., Gabrilovich DI. et al: Izucenie funkcii elementov krvi i likvora bolnikh gnoinom meningitu. *Ter Arkh* 1992; 64 (11): 31-34.
- Lowry OH., Rosebrough NJ., Faar AL. and Randall RJ.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-270.
- Reider HP.: Eine neue Modifikation der Cu-Folin-Methode zur Bestimmung des Totalproteins im Liquor cerebrospinalis. *Klin Wschr* 1966; 44; 1036-1039.
- Seiber A.: Plasmaproteinbestimmung durch Laser-Nephelometrie: Laborpraxis. *Laboratoriumsblätter* 1977; 27; 109-118.
- Reiber H.: The Discrimination Between Different Blood-CSF Barrier Dysfunctions and Inflammatory Reactions of the CNS by a Recent Evaluation Graph for the Protein Profile of Cerebrospinal Fluid. *J Neurol* 1980; 224: 89-93.
- Metclaf JA., Gallin JL., Nauseef WM. and Root RK.: Myeloperoxidase functional assays; in *Laboratory manual of neutrophil function*; Raven Press; New York; 1986.
- Oemichen M., Doumasch D. and Weitholter H.: Origin, proliferation and fate of cerebrospinal fluid cells. *J Neurol* 1982; 227; 145-150.
- Malley R., Huskins C. and Kuppermann N.: Multivariable predictive models for adverse outcome of invasive meningococcal disease in children. *J Pediatr* 1996; 129; 702-707.
- Weiss SJ.: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989; 320; 365-371.
- Kastenbauer S., Pfister H.W.: Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. *Brain* 2003; 126: 1015-1025.
- Grimwood K., Andreson P., Anderson V., Tan L., Nolan T.: Twelve year outcomes following bacterial meningitis: further evidence for persisting effects. *Arch Dis Child* 2000; 83: 111-116.
- Leib SL., Clements J., Tauber MG. et al.: Inhibition of matrix metalloproteinases and tumor necrosis factor alpha converting enzyme as adjuvant therapy in pneumococcal meningitis. *Brain* 2001; 124; 1734-1742.
- Leppert D., Leib SL., Grygar C. et al.: Matrix metalloproteinase MMP-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. *Clin Infect Dis* 2000; 31; 80-84.
- Rosenberg GA.: Matrix Metalloproteinases in Neuroinflammation. *Glia* 2002; 39; 279-291.
- Meli ND., Christen S., Leib LS.: Matrix Metalloproteinase-9 in Pneumococcal Meningitis: Activation via an Oxidative Pathway. *J Infect Dis* 2003; 187; 1411-1415.