

7universum.com  
**UNIVERSUM:**

МЕДИЦИНА И ФАРМАКОЛОГИЯ

---

## ЦИТОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ В НЕЙТРОФИЛАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

**Василенко Дмитрий Викторович**

*канд. мед. наук, доцент, ВГМА им. Н.Н. Бурденко,  
зав. лабораторией ООО «Медицинский центр «ДиАл-Мед»,  
РФ, г. Воронеж  
E-mail: [postmaster@vas.vrn.ru](mailto:postmaster@vas.vrn.ru)*

**Маслов Алексей Иванович**

*младший научный сотрудник, ВГМА им. Н.Н. Бурденко,  
генеральный директор ООО Медицинский центр «ДиАл-Мед»,  
РФ, г. Воронеж  
E-mail: [maslov@vas.vrn.ru](mailto:maslov@vas.vrn.ru)*

**Адуев Махач Сулайманович**

*студент 5 курса педиатрического факультета ВГМА им. Н.Н. Бурденко,  
РФ, г. Воронеж*

**Оников Михаил Михайлович**

*студент 6 курса педиатрического факультета ВГМА им. Н.Н. Бурденко,  
РФ, г. Воронеж*

## CYTOPHOTOMETRIC DETERMINATION OF THE ACTIVITY OF PEROXIDASE IN PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS

**Vasilenko Dmitry**

*candidate of Medical Science,  
associate professor of Voronezh State Medical Academy of N.N. Burdenko,  
Head of the Laboratory of medical center "DiAl-Med",  
Russia, Voronezh*

**Maslov Alexey**

*junior researcher of Voronezh State Medical Academy of N.N. Burdenko,  
general manager of medical center "DiAl-Med",  
Russia, Voronezh*

***Aduev Makhach***

*5th year student of pediatric faculty  
of Voronezh State Medical Academy of N.N. Burdenko,  
Russia, Voronezh*

***Onikov Michail***

*6th year student of pediatric faculty  
of Voronezh State Medical Academy of N.N. Burdenko,  
Russia, Voronezh*

## **АННОТАЦИЯ**

Многие патологические состояния сопровождаются изменением активности внутриклеточных ферментов. При определении ферментов во внеклеточной среде возможно изменение условий функционирования молекул в связи с влиянием другого микроокружения. Разработанный метод позволяет определять константу Михаэлиса и максимальную скорость реакции ферментов внутри клеток и оценивать влияние внешних факторов на внутриклеточные процессы.

## **ABSTRACT**

Many pathological conditions accompanied by changes in the activity of intracellular enzymes. When determining the enzymes in the extracellular environment, you may change the conditions for the functioning of molecules due to the influence of another microenvironment. The developed method allows to determine the Michaelis constant and maximum velocity reactions enzymes inside the cells and assess the influence of external factors on the intracellular processes.

**Ключевые слова:** пероксидаза, нейтрофилы, константа Михаэлиса, максимальная скорость реакции.

**Key words:** peroxidase, neutrophils, Michaelis constant, maximum reaction rate.

Актуальность исследования. Все биохимические процессы в организме регулируются ферментами. Многие лекарственные препараты проявляют свое действие через изменение активности ферментов, находящихся внутри клеток.

Из внутриклеточных ферментов представляет интерес миелопероксидаза нейтрофилов. Данный фермент участвует в окислительном метаболизме и, соответственно, в антимикробной защите. При патологических состояниях активность миелопероксидазы может существенно изменяться. При остром коронарном синдроме было выявлено повышение активности миелопероксидазы [5, с. 1]. В работе Базарного В.В. было выявлено снижение активности миелопероксидазы в нейтрофилах при ИБС [1, с. 9]. В работе Жаворонок Т.В. [3, с. 85] выявлено увеличение активности миелопероксидазы при внебольничной пневмонии.

Для изучения влияния различных веществ и патологических процессов на активность внутриклеточных ферментов используются методы разрушения клеток с последующей очисткой и концентрированием изучаемых веществ. Недостатком данной модели является изучение свойств выделенных ферментов в отрыве от их внутриклеточного окружения. Конформация белка во внеклеточной среде может существенно измениться, что будет приводить к изменению кинетических параметров фермента. Это не позволит корректно оценить изменение активности фермента.

Цель исследования — установить возможность определения кинетических характеристик пероксидазы в нейтрофилах без разрушения клеток. Задачи исследования — определить константу Михаэлиса ( $K_m$ ) и максимальную скорость ферментативной реакции ( $V_{max}$ ) пероксидазы в нейтрофилах периферической крови путем цитофотометрии окрашенных препаратов на стекле.

Методы исследования. Исследовались нейтрофилы стабилизированной гепарином периферической крови условно здоровых лиц. Выявление пероксидазы проводилось по методу Грэхема-Кнолля [4, с. 310]. Мазки крови фиксировались 30 секунд в охлажденном 4 % формалино-спиртовом растворе

и споласкивались в проточной воде. Окрашивание проводили в насыщенном спиртовом растворе бензидина с различными концентрациями перекиси водорода в течение 5 минут при температуре 37 градусов Цельсия. Мазки промывались в проточной воде и высушивались на воздухе в темноте. Сухие мазки микроскопировали с иммерсией. Изображения микропрепаратов переводили в цифровую форму с помощью аналоговой видеокамеры Sony и системы захвата изображения. Для обработки полученных изображений клеток использовалась компьютерная программа Image Tool.

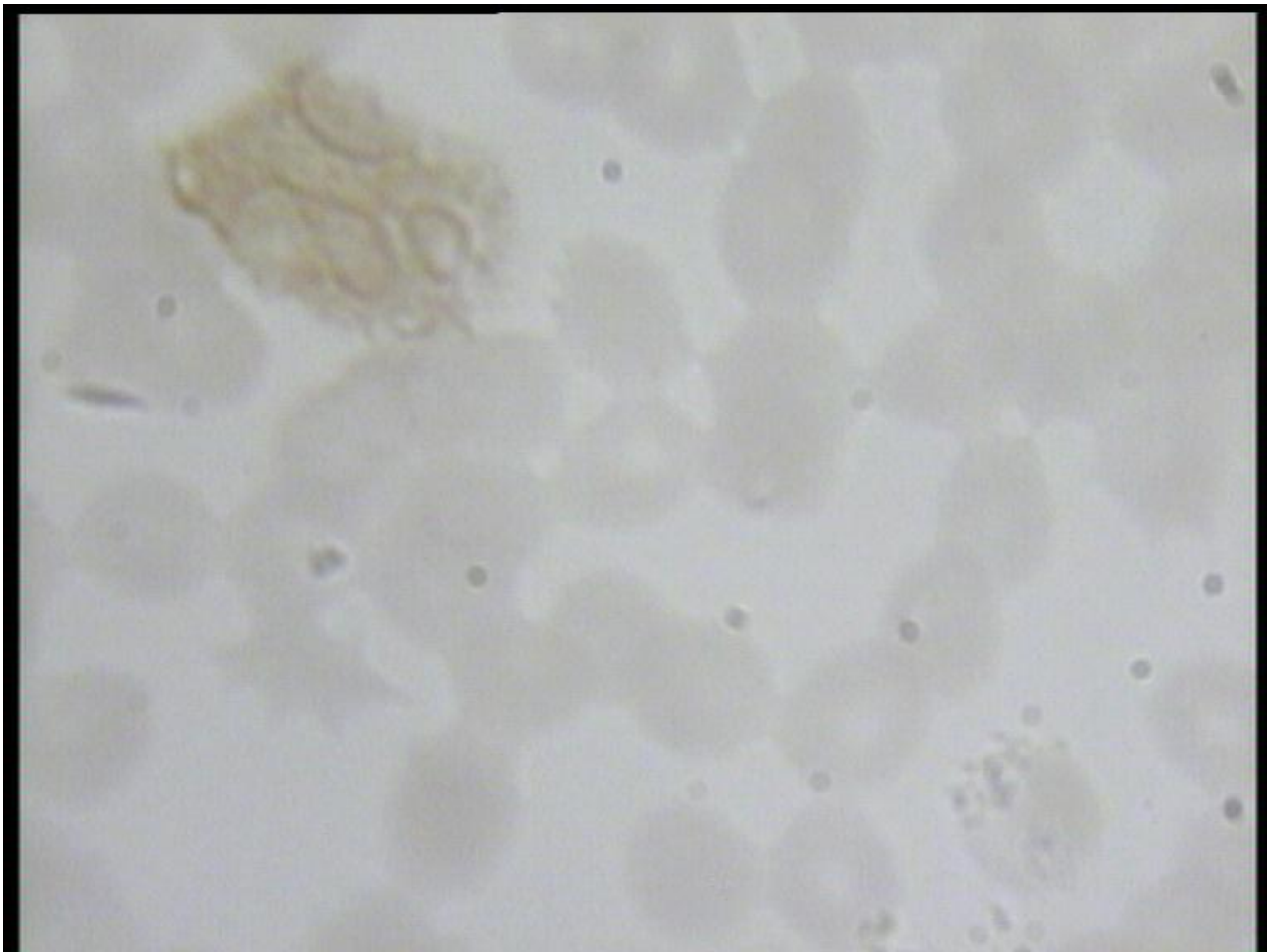
Для определения кинетических характеристик фермента необходимо знать количество образующегося продукта при разных концентрациях субстрата. Согласно закону Ламберта-Бэра количество вещества пропорционально экстинкции. Определение экстинкции окисленного бензидина проводилось по следующей схеме. Вначале выделяется область препарата, в которой отсутствуют клеточные элементы. Рассчитывается суммарное количество пикселей в этой области и суммарная яркость всех пикселей. Вычисляется средняя яркость пикселя, что соответствует интенсивности света, падающего на клетку, расположенную на стекле. На втором этапе определяется количество пикселей и их суммарная яркость в области расположения клетки. Рассчитывается средняя яркость, что соответствует интенсивности света, прошедшей через клетку. Десятичный логарифм отношения света, падающего на клетку, и света, прошедшего через клетку, составляет экстинкцию. Умножив среднюю экстинкцию пикселя на количество пикселей, получаем суммарную оптическую плотность клетки в условных единицах.

Используя различные концентрации субстрата (перекиси водорода), можно построить график Михаэлиса и путем преобразования в уравнение Лайнуивера-Бэрка рассчитать константу Михаэлиса и максимальную скорость ферментативной реакции [2, с. 138].

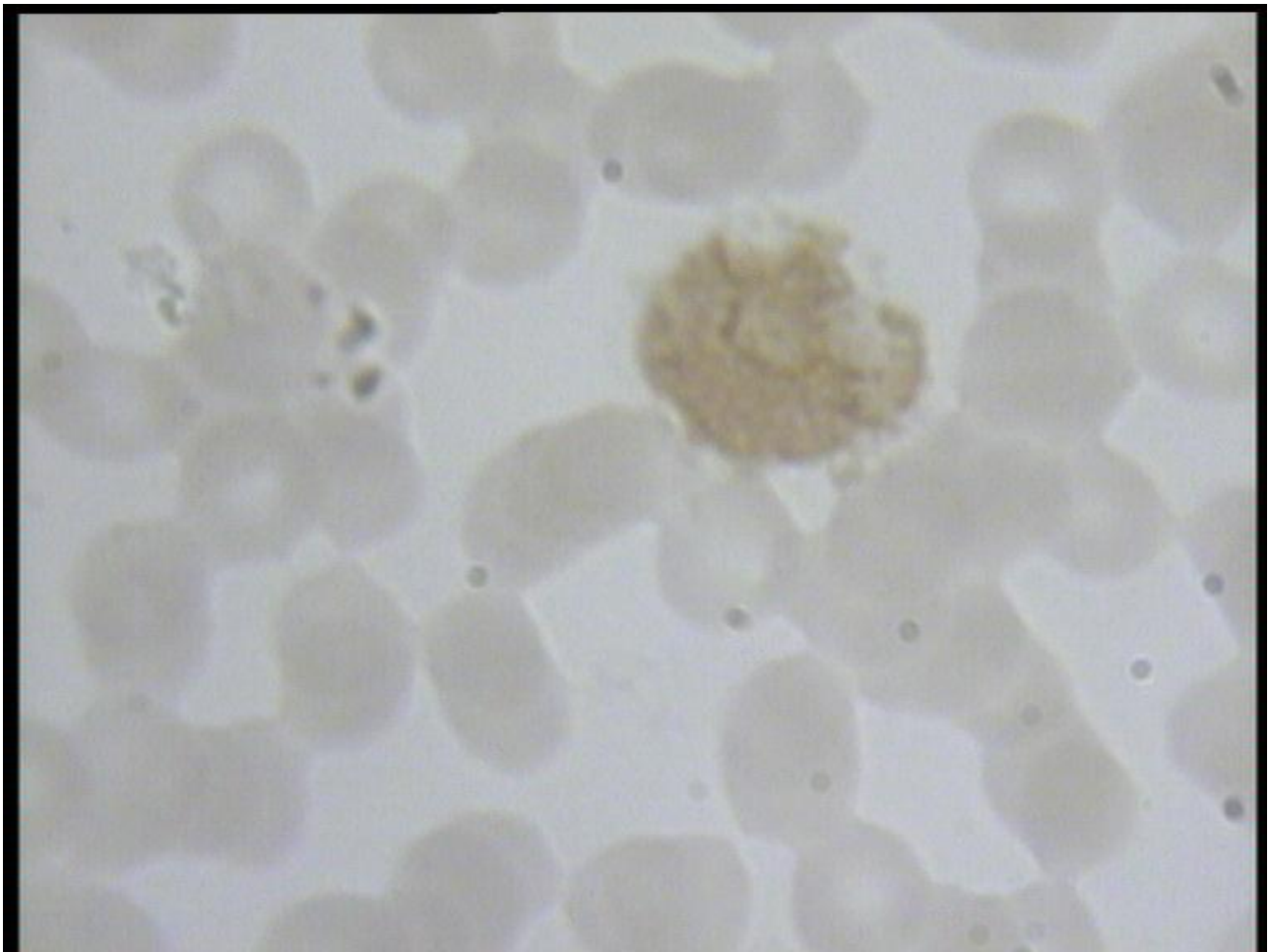
Результаты исследования.

При окрашивании препаратов в инкубационной среде, содержащей 140 мкм/л пероксида водорода, получены две популяции клеток. Клетки

с низкой активностью пероксидазы составили 27 % и с высокой активностью соответственно 73 %. Исследованы морфометрические показатели клеток двух популяций. Не обнаружено достоверных различий между площадью клеток и площадью, занимаемой гранулами пероксидазы. Концентрация окисленного бензидина в клетках с низкой активностью пероксидазы составила  $303 \pm 61$  единиц оптической плотности (е.о.п.), а в клетках с высокой активностью  $723 \pm 69$  е.о.п. Для расчета кинетических характеристик пероксидазы исследованы мазки крови, окрашенные субстратным раствором, содержащим 280 и 420 мкм/л пероксида водорода. Микрофотографии нейтрофилов мазков периферической крови при инкубации в среде, содержащей 140 и 420 мкм/л перекиси водорода, представлены на рисунках 1 и 2. Распределение клеток с высокой и низкой активностью пероксидазы в мазках крови было аналогичным предыдущему исследованию. При концентрации пероксида водорода в инкубационной среде 280 мкм/л концентрация окисленного бензидина составила соответственно  $395 \pm 53$  и  $942 \pm 22$  е.о.п. При концентрации субстрата 420 мкм/л количество продукта составило  $443 \pm 72$  и  $1124 \pm 84$  е.о.п. Расчет кинетических параметров пероксидазы нейтрофилов дал следующие результаты.



*Рисунок 1. Микрофотография нейтрофила в мазке периферической крови при окрашивании на пероксидазу с содержанием 140 мкм/л перекиси водорода в инкубационной среде*



***Рисунок 2. Микрофотография нейтрофила в мазке периферической крови при окрашивании на пероксидазу с содержанием 420 мкм/л перекиси водорода в инкубационной среде***

При использовании в расчете активности фермента при концентрации субстрата 140 и 280 мкм/л константа Михаэлиса составила 122 мкм/л для клеток с низкой активностью пероксидазы и 121 мкм/л для клеток с высокой активностью. Максимальная скорость реакции составила соответственно 567 и 1351 единиц. Для проверки линейности графика Лайнуивера-Бэрка использована контрольная концентрация субстрата 420 мкм/л. Константа Михаэлиса для клеток с низкой активностью составила 126 мкм/л, а для клеток с высокой активностью 161 мкм/л. Расчет максимальной скорости ферментативной реакции составил соответственно 576 и 1555 единиц. Следовательно, для клеток с низкой активностью фермента имеется линейность графика Лайнуивера-Бэрка на всех трех концентрациях субстрата. Для клеток с высокой активностью пероксидазы имеется незначительное отклонение

линейности, что необходимо учитывать в дальнейшем при выборе концентраций субстрата.

При анализе кинетических параметров пероксидазы выявлено, что в клетках с высокой и низкой активностью фермента константа Михаэлиса существенно не различается. Изменения активности связаны с увеличением максимальной скорости ферментативной реакции у пероксидазы клеток с высокой активностью фермента.

Таким образом, различия в активности фермента связаны, видимо, с микроокружением фермента в клетке, а не с количеством синтезированного фермента. Полученные данные могут быть использованы в лабораторной диагностике для контроля за функциональным состоянием нейтрофилов крови.

#### **Список литературы:**

1. Базарный В.В. Определение миелопероксидазы нейтрофилов при хирургическом лечении ишемической болезни сердца / В.В. Базарный, Е.Н. Тихонина, К.В. Кондрашов // Клиническая лабораторная диагностика. — 2012. — № 7. — с. 8—10.
2. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. — М.: Мед, 1998. — 704 с.
3. Жаворонок Т.В. Оценка окислительной модификации белков и метаболический статус нейтрофилов при внебольничной пневмонии в зависимости от характера легочного инфильтрата / Т.В. Жаворонок и др. // Клиническая лабораторная диагностика. — 2007. — № 9. — с. 85.
4. Луппа Х. Основы гистохимии. — М.: Мир, 1980. — 344 с.
5. Рулева Н.Ю. Миелопероксидаза: биологические функции и клиническое значение / Н.Ю. Рулева, М.А. Звягинцева, С.Ф. Дугин // Современные наукоемкие технологии. — 2007. — № 8. — с. 1—4.



## References:

1. Bazarnyi V.V. Determination of myeloperoxidase of neutrophils under operative therapy of ischemic heart disease. *Klinicheskaiia laboratornaia diagnostika*, [Clinical pathology], 2012. no. 7, pp. 8 — 10 (In Russian).
2. Berezov T.T., Korovkin B.F. Biological chemistry. Moscow, Med. Publ., 1998. 704 p. (In Russian).
3. Zhavoronok T.V. Assessment of protein oxidative modification and metabolic status of neutrophils under community-acquired pneumonia depending on the nature of pulmonary infiltration. *Klinicheskaiia laboratornaia diagnostika*, [Clinical pathology], 2007. no. 9, p. 85. (In Russian).
4. Luppа Kh. Fundamentals of histochemistry. Moscow, Mir Publ., 1980. 344 p. (In Russian).
5. Ruleva N.Iu. Myeloperoxidase: biological functions and clinical relevance. *Sovremennye naukoemkie tekhnologii*. [Modern high technologies], 2007. no. 8, pp. 1 — 4 (In Russian).