

УДК 616.155.34/.394.5-06:616.2-001-036.1]-092.9

А.А.Гудима, М.І.Марущак, Г.Г.Габор, М.І.Куліцька

**ПАТОГЕНЕТИЧНА РОЛЬ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ  
У РОЗВИТКУ ГОСТРОГО УРАЖЕННЯ ЛЕГЕНЬ**

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я.Горбачевського»

**Резюме.** Досліджено рівень загальних лейкоцитів та нейтрофільних гранулоцитів у крові та бронхоальвеолярному змиві експериментальних тварин у різні фази гострого ураження легень. Отримані результати вказують на те, що із прогресуванням гострого ураження легень зменшується клітинність крові, тоді як у бронхо-

альвеолярному змиві зростає рівень лейкоцитів, в основному за рахунок нейтрофілів.

**Ключові слова:** нейтрофільні гранулоцити, бронхоальвеолярний змив, гостре ураження легень

**Вступ.** НСІ-індуковане легенеve ураження належить до найчастіших причин смерності післяопераційних хворих та пацієнтів відділень інтенсивної терапії. В його основі лежить розвиток аспіраційного пневмоніту, який може завершуватися гострим ураженням легень (ГУЛ) та гострим респіраторним дистрес-синдром (ГРДС), що належать до найбільш загрозливих ускладнень [9], і є причиною смерті близько 38 % таких осіб [16]. Сепсис, травма, масивні трансфузії є екстрапульмональними причинами ГУЛ, проте пневмонія та аспірація шлунковим вмістом є визначальними факторами внутрішньолегенового пошкодження [14].

ГУЛ характеризується швидким розвитком легеневого запалення з акумуляцією великої кількості нейтрофілів у легенях, ендотеліальною та епітеліальною дисфункцією, зростанням рівня прозапальних цитокінів та хемокінів у легенях [4]. Проведені численні дослідження в галузі пульмонології вказують на те, що при легневих захворюваннях спостерігаються порушення певних ланок імунної системи, зокрема, суттєві зміни визначено у функціональному стані нейтрофільних гранулоцитів (НГ) [1, 2]. НГ, швидше за все, відіграють важливу роль у розвитку ГУЛ. Проведений аналіз літератури вказує на те, що тяжкість ГУЛ зменшується, коли нейтрофіли еліміновані до впливу певного патогенетичного чинника ураження легень [3, 5, 11, 12, 18]. Також досліджено, що в пацієнтів із нейтропенією найчастіше погіршення легеневої функції і прогресування ГУЛ спостерігається при нормалізації числа НГ [6, 15]. Проте в джерелах літератури наукових досліджень містяться суперечливі дані щодо рівня НГ у крові експериментальних тварин при розвитку ГУЛ [3, 4, 5, 9, 11, 12]. Найбільш поширена думка вказує на те, що при гострому легневому пошкодженні активовані НГ виходять із судинного русла і мігрують через інтерстицій у альвеолярний простір, що зумовлює нейтропенію [7, 8].

**Мета дослідження.** З'ясувати роль загальних лейкоцитів та нейтрофільних гранулоцитів у крові та бронхоальвеолярному лаважі експериментальних тварин у патогенезі розвитку гострого ураження легень.

**Матеріал і методи.** Досліди проведені на 24 білих статевозрілих нелінійних щурах масою 200-220 г, що утримувалися на стандартному

раціоні віварію Тернопільського державного медичного університету імені І.Я.Горбачевського. Тварин розподілили на 4 групи: 1-а – контрольна група, спостереження через 2 год, 2-а – контрольна група, спостереження через 6 год, 3-я – моделювання ГУЛ, спостереження через 2 год, 4-а – моделювання ГУЛ, спостереження через 6 год.

Для дослідження вибрали нейтрофіль-залежну експериментальну модель ГУЛ [10]. Тварин анестезували внутрішньоочеревинним введенням тіопенталу натрію в дозі 40 мг/кг маси тварини. Вентральний бік шиї обробляли хлоргексидином і робили 0,5 см серединний розріз для візуалізації трахеї. Тварин розміщували горизонтально під кутом 45°, інсуліновим шприцом вводили в трахею НСІ, рН 1,2 в дозі 1,0 мл/кг на вдиху. Тваринам контрольної групи вводили фізіологічний розчин в аналогічній дозі.

Через 2 та 6 годин тварин знову анестезували тіопенталом натрію в дозі 90 мг/кг маси тварини. Для одержання бронхоальвеолярного змиву тваринам вводили інтратрахеально 2 мл стерильного фізіологічного розчину, який через 1 хв забирали. Дану процедуру повторювали 3 рази. Отриманий бронхоальвеолярний змив центрифугували протягом 10 хв при 3000 об. Супернатант збирали для наступних досліджень, а з отриманого осаду готували мазки, які забарвлювали за методом Папенгейма для підрахунку НГ. Загальну кількість лейкоцитів периферичної крові рахували в камері Горяєва, лейкоцитарну формулу рахували в мазку, забарвленому за методом Папенгейма.

Отриманий цифровий матеріал обробляли методом варіаційної статистики з використанням критерію Стьюдента.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Вважається, що основою синдрому ГУЛ є неспецифічна запальна реакція на рівні мікросудин легень з порушенням легеневого гомеостазу, що ініціюється активацією нейтрофільних гранулоцитів крові, які частково вивчено в клінічних та експериментальних дослідженнях [3, 11, 16]. В умовах нейтрофільної активації легень є первинним органом ураження внаслідок розвинутого русла мікроциркуляції, де при гіпоксії відбувається секвестрація активованих нейтрофілів.

Таблиця 1

Загальна кількість лейкоцитів і відсотковий вміст нейтрофільних гранулоцитів у периферичній крові експериментальних тварин з модельованим гострим ураженням легень ( $x \pm Sx$ )

Показник	Група 1 Контроль на 2 год (n=6)	Група 2 Контроль на 6 год (n=6)	Група 3 Дослід на 2 год (n=6)	Група 4 Дослід на 6 год (n=6)
Лейкоцити, $10^9/\text{л}$	12,45±0,40	12,72±0,37	7,52±0,22***	5,35±0,24*** p<0,001
Нейтрофільні гранулоцити, %	30,00±0,93	25,50±0,57	63,83±0,98***	71,17±0,83*** p<0,001
Лімфоцити, %	67,50±0,72	68,33±0,67	34,33±1,20***	27,17±0,83*** p<0,001

Таблиця 2

Загальна кількість лейкоцитів та відсотковий вміст нейтрофільних гранулоцитів у бронхоальвеолярному змиві експериментальних тварин із модельованим гострим ураженням легень ( $x \pm Sx$ )

Показник	Група 1 Контроль на 2 год (n=6)	Група 2 Контроль на 6 год (n=6)	Група 3 Дослід на 2 год (n=6)	Група 4 Дослід на 6 год (n=6)
Лейкоцити, $10^9/\text{л}$	1,08±0,09	1,15±0,08	2,07±0,08***	3,05±0,15*** p<0,001
Нейтрофільні гранулоцити, %	0,43±0,08	0,48±0,06	29,17±1,85***	69,33±2,85*** p<0,001

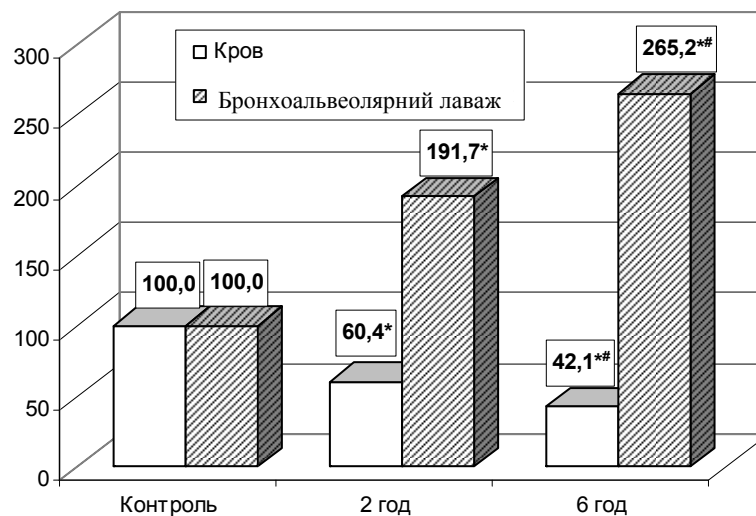


Рис. 1. Загальна кількість лейкоцитів при HCl-індукованому гострому ураженні легень у крові та бронхоальвеолярному лаважі (\* – p<0,001 порівняно з контролем; # – p<0,001 порівняно з визначенням на 2-у годину)

Проведене нами дослідження вказало на те (табл. 1), що в першу фазу (перші 2 год пошкодження) ГУЛ у крові експериментальних тварин спостерігалось зниження рівня лейкоцитів у 1,66 раза, при цьому НГ перевищували на 29 % показники контрольної групи ( $4,80 \pm 0,13 \cdot 10^9/\text{л}$  порівняно з нормою  $3,72 \pm 0,19 \cdot 10^9/\text{л}$ ).

У той же час, у бронхоальвеолярному змиві через 2 год після моделювання ГУЛ відмічався як виражений лейкоцитоз (рівень лейкоцитів зростає в 1,92 раза), так і нейтрофільний гранулоцитоз –  $0,61 \pm 0,06 \cdot 10^9/\text{л}$  порівняно з контрольною групою  $0,005 \pm 0,001 \cdot 10^9/\text{л}$  (табл. 2).

Перша фаза HCl-індукованого ГУЛ, як свідчать дані літератури [8], може виникати внаслідок фізико-хімічних процесів або капсаїцинчутливих аферентних нервів. Тахікініни вивільняються з чутливих нервових волокон у легенях після дії капсаїцину і є основними в розвитку набряку слизової оболонки дихальних шляхів.

ГУЛ, що тривало 6 год, зумовило прогресування змін, які виникли в перші години легеневого пошкодження хлоридною кислотою. Ця фаза, що характеризується гострою забальною відповіддю, опосередкована нейтрофілами. У крові спостерігалась виражена лейкопенія, достовірно

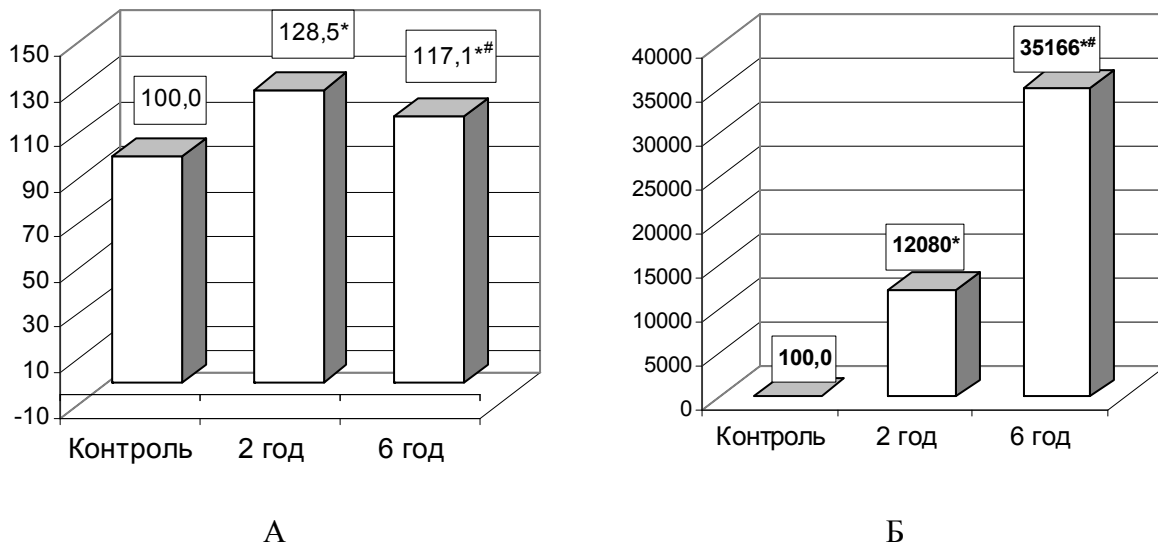


Рис. 2. Рівень нейтрофільних гранулоцитів при HCl-індукованому гострому ураженні легень у крові (А) та бронхоальвеолярному лаважі (Б)

зріс відсоток НГ порівняно з 2-ю та 3-ю дослідними групами.

Порівнюючи клітинний склад бронхоальвеолярного змиву 4-ї групи, відмічено значне підвищення рівня лейкоцитів та виражений нейтрофільний гранулоцитоз ( $2,12 \pm 0,14 \cdot 10^9/\text{л}$ ), що в 3,5 раза перевищував показники 3-ї групи.

Отримані результати вказують на те, що із прогресуванням ГУЛ зменшується клітинність крові, тоді як у бронхоальвеолярному змиві зростає рівень лейкоцитів, в основному за рахунок нейтрофілів (рис. 1, 2).

Отримані результати підтверджують припущення про регіонарну секвестрацію нейтрофілів в легенях в умовах гострого ураження легень та гострого респіраторного дистрес-синдрому. Внаслідок цього в периферичній крові має місце зниження нейтрофілів, що зумовлює зниження метаболічного резерву нейтрофілів периферичної крові. Це збігається з сучасними уявленнями про участь нейтрофілів у пусковому механізмі розвитку даного патологічного стану, які в активованому стані утворюють та вивільняють кисневі радикали, секреторні дегранулянти, що мають пряму пошкодуючу дію на ендотеліальні клітини [17]. У цих умовах у легенях підвищується внутрішньосудинне зсідання крові та порушується регіонарна мікроциркуляція, що призводить до прогресивного зростання НГ у бронхоальвеолярному змиві [19]. Патогенетичними наслідками впливу біологічних компонентів системнозапального медіаторного каскаду є зміни легеневої ендотеліальної фізіології [13].

#### Висновок

У патогенезі розвитку гострого ураження легень провідна роль відводиться нейтрофільним гранулоцитам крові. Із прогресуванням патологічного процесу зменшується кількість лейкоцитів у крові, тоді як у бронхоальвеолярному змиві – зростає, в основному, за рахунок нейтрофілів.

**Перспективи подальших досліджень.** У перспективі планується дослідити продукти метаболічного “вибуху” НГ, а саме, – активні форми кисню та оксид азоту, та вивчити їх патогенетичну роль у розвитку та прогресуванні ГУЛ.

#### Література

1. Иммунологический мониторинг больных хроническим обструктивным бронхитом в динамике иммунореабилитации / М.В.Чихладзе, Я.Р.Сепиашвили, Э.Ш.Сапир [и др.] // Аллергология и иммунология. – 2003. – Т. 4, № 2. – С. 209.
2. Чернушенко Е.Ф. Иммунопатогенез неспецифических заболеваний легких / Е.Ф.Чернушенко // Ж. практ. лікаря. – 2004. – № 4. – С. 7-13.
3. Abraham E. Neutrophils and acute lung injury / E. Abraham // Crit. Care Med. – 2003. – Vol. 31. – P. 195-199.
4. Acid aspiration-induced lung inflammation and injury are exacerbated in NADPH oxidase-deficient mice / H. Segal Brahm, A. Davidson Bruce, D. Hutson Alan [et al.] // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 2007. – Vol. 292. – P. 760-768.
5. Chignard M. Neutrophil recruitment and increased permeability during acute lung injury induced by lipopolysaccharide / M.Chignard, V.Balloy // Am. J. Physiol. – 2000. – Vol. 279. – P. 1083-1090.
6. Deterioration of previous acute lung injury during neutropenia recovery / E.Azoulay, M.Darmon, C.Delclaux [et al.] // Crit. Care Med. – 2002. – Vol. 30. – P. 781-786.
7. Doerschuk C.M. Leukocyte trafficking in alveoli and airway passages / C.M.Doerschuk // Respir. Res. – 2008. – Vol. 1. – P. 136-140.
8. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated / K.Ley, C.Laudanna, M.I.Cybulsky [et al.] // Nat. Rev. Immunol. – 2007. – Vol. 7. – P. 678-689.

9. Marik P.E. Aspiration pneumonitis and aspiration pneumonia / P.E.Marik // *N. Engl. J. Med.* – 2001. – Vol. 344. – P. 665-671.
10. Matute-Bello G. Animal models of acute lung injury / G.Matute-Bello, C.Frevert, T.Martin // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2008. – Vol. 295. – P. 379-399.
11. Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury / E.Abraham, A.Carmody, R.Shenkar [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 2000. – Vol. 279. – P. 1137-1145.
12. Neutrophils play a critical role in development of LPS-induced airway disease / J.D.Savov, S.H.Gavett, D.M.Brass [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 2002. – Vol. 283. – P. 952-962.
13. Padmam P. Chemokines in acute respiratory distress syndrome / P.Padmam, M.Shabbir, B.Madhav // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2005. – № 288. – P. 3-15.
14. Progressive, severe, lung injury secondary to the interaction of insults in gastric aspiration / P.R.Knight, B.A.Davidson, T.A.Russo [et al.] // *Exp. Lung Res.* – 2004. – Vol. 30. – P. 535-557.
15. Rinaldo J.E. Deterioration of oxygenation and abnormal lung microvascular permeability during resolution of leukopenia in patients with diffuse lung injury / J.E.Rinaldo, H.Borovetz // *Am. Rev. Respir. Dis.* – 1985. – Vol. 131. – P. 579-583.
16. Rubenfeld G.D. Incidence and outcomes of acute lung injury / G.D.Rubenfeld // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – Vol. 353. – P. 1685-1693.
17. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury / J.Reutershan, A.Basit, E.V.Galkina [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2005. – Vol. 289, № 5. – P. 807-815.
18. The critical role of hematopoietic cells in lipopolysaccharide-induced airway inflammation / J.W.Hollingsworth, B.J.Chen, D.M.Brass [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2005. – Vol. 171. – P. 806-813.
19. Wright R. M. Mononuclear Phagocyte Xanthine Oxidoreductase Contributes to Cytokine-Induced Acute Lung Injury / R.M.Wright, L.A.Ginger, N.Kosila [et al.] // *Am. J. of Respiratory Cell and Molecular Biology.* – 2004. – Vol. 30. – P. 479-490.

#### ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ РОЛЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ В РАЗВИТИИ ОСТРОГО ПОРАЖЕНИЯ ЛЕГКИХ

*А.А.Гудима, М.И.Марущак, Г.Г.Габор, М.И.Кулицкая*

**Резюме.** Исследован уровень общих лейкоцитов и нейтрофильных гранулоцитов в крови и бронхоальвеолярном смыве экспериментальных животных в разные фазы острого поражения легких. Полученные результаты указывают на то, что по мере прогрессирования острого поражения легких уменьшается клеточность крови, тогда как в бронхоальвеолярном смыве растет уровень лейкоцитов, в основном за счет нейтрофилов.

**Ключевые слова:** нейтрофильные гранулоциты, бронхоальвеолярный смыв, острое поражение легких.

#### PATHOGENETIC ROLE OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN THE DEVELOPMENT OF ACUTE LUNG INJURY

*A.A.Hudyma, M.I.Marushchak, H.H.Habor, M.I.Kulitska*

**Abstract.** The level of general leukocytes and neutrophilic granulocytes in the blood and bronchoalveolar lavage of experimental animals at different phases of acute lung lesion has been examined. The obtained results indicate that with a progression of acute lung injury cellular blood character is reduced, whereas the level of leukocytes in the bronchoalveolar lavage elevates, primarily at the expense of neutrophils.

**Key words:** neutrophilic granulocytes, bronchoalveolar lavage, acute lung injury.

SHEE “State Medical University named after I.Ya. Horbachevskiy” (Ternopil’)

Рецензент – проф. Ю.Є.Роговий

Buk. Med. Herald. – 2011. – Vol. 15, № 3 (59). – P. 82-85

Надійшла до редакції 29.04.2011 року