

© М.І. Марущак, 2012

УДК 612.014.464+612.127]-02:616.24-036.11-092.9

М.І. МАРУЩАК

Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського, медичний факультет, кафедра клініко-лабораторної діагностики, Тернопіль

ВСТАНОВЛЕННЯ КОРЕЛЯЦІЙНИХ ЗВ'ЯЗКІВ МІЖ РІВНЕМ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ, ВМІСТОМ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ ТА ГАЗОВИМ СКЛАДОМ КРОВІ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГОСТРОМУ УРАЖЕННІ ЛЕГЕНЬ

Проведено порівняльний аналіз кореляційних зв'язків між рівнем активних форм кисню в крові та бронхоальвеолярному змиві та вмістом нейтрофілів і газовим складом крові. Встановлено, що НСІ-індукованому гострому ураженні легень наявний сильний негативний корелятивний зв'язок активних форм кисню в нейтрофілах крові з рівнем рН крові у 2-й та 3-й експериментальних групах. У бронхоальвеолярному змиві рівень активних форм кисню в нейтрофілах корелював з кількістю лейкоцитів та нейтрофільних гранулоцитів на 6, 12 і 24 години експерименту (прямої зв'язок), рівнем рН крові через 2 та 6 годин досліду та з pO_2/FiO_2 протягом часу спостереження (обернений зв'язок).

Ключові слова: гостре ураження легень, активні форми кисню, нейтрофільні гранулоцити, газу крові

Вступ. Гостре ураження легень (ГУЛ) залишається однією з основних причин гострої дихальної недостатності та смерті хворих. Не зважаючи на досягнення на сучасному етапі в лікуванні, захворюваність і летальність від ГУЛ залишаються високими [11, 13]. Недавно проведене міжнародне епідеміологічне дослідження ГУЛ показало, що рівень смертності пацієнтів з цим синдромом є досить високим і становить 60,2 %, причому даний відсоток суттєво не відрізняється в різних частинах світу. Так, у Північній Америці летальність від ГУЛ складає 52,5 %, в Європі – 64,2%, в Латинській Америці – 59,3 % [4].

Хоча ГУЛ є гетерогенним захворюванням і може бути викликано як легеневидами, так і позалегеневидами етіологічними чинниками, в його основі лежать спільні патогенетичні механізми: неспецифічна запальна реакція на дію патогенних факторів, секвестрація нейтрофілів у легені та пошкодження судинної стінки, активація цитокінової системи, «кисневий спалах», зниження продукції і активності сурфактанту та інші [3, 8, 10].

Проведені нами попередні дослідження вказують на велику роль у патогенезі розвитку ГУЛ нейтрофільних гранулоцитів. Доведено, що у міру прогресування патологічного процесу зменшується кількість лейкоцитів у крові, тоді як у бронхоальвеолярному змиві – зростає, в основному за рахунок нейтрофілів [3, 12]. Нами встановлено, що в перші години ГУЛ розвивається респіраторний ацидоз за рахунок легеневого набряку і бронхообструкції, що зумовлює порушення вентиляційно-перфузійного балансу, який компенсується через 12 годин експерименту [1, 7]. Нами показано, що при ГУЛ як у крові, так і в бронхоальвеолярному змиві достовірно зростає рівень активних форм кисню у міру прогресування захворювання, що підтверджується даними інших дослідників [14]. При співставленні результатів рівня АФК

нейтрофілів у плазмі крові та гомогенаті легень щурів із модельованим гідрохлоридним ГУЛ виявлено синхронний розвиток окисного стресу на системному і місцевому рівнях з переважанням легеневого окисного спалаху.

Проте глибше розуміння патогенетичних ланок ГУЛ, виявлення предикторів, які позитивно або негативно впливають на перебіг цього синдрому, взаємозв'язок між певними механізмами розвитку дозволять вдосконалити терапевтичні стратегії щодо хворих із ГУЛ, що обумовлює актуальність даного дослідження.

Мета дослідження. На основі проведення порівняльного аналізу кореляційних зв'язків між рівнем активних форм кисню у крові та бронхоальвеолярному змиві та вмістом нейтрофілів і газовим складом крові у щурів виявити додаткові патогенетичні механізми формування гострого ураження легень.

Матеріали та методи. Досліди були проведені на 108 білих статевозрілих нелінійних щурах масою 200-220 г, що утримувались на стандартному раціоні виварію Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського. Тварин розділили на 4 групи: 1-а – контрольна група (n=12), 2-а – моделювання ГУЛ, спостереження через 2 год. (n=12), 3-я – моделювання ГУЛ, спостереження через 6 год (n=12), 4-а – моделювання ГУЛ, спостереження через 12 год (n=12), 5-а – моделювання ГУЛ, спостереження через 24 год (n=12).

Для дослідження вибрали нейтрофіл-залежну експериментальну модель ГУЛ [9]. Тварин анестезували внутрішньоочеревинним введенням тіопенталу натрію в дозі 40 мг/кг маси тварини. Вентральну сторону 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.

Для одержання бронхоальвеолярного змиву (БАЗ) 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 фарбували за Папенгеймом і виділяли нейтрофіли. Популяцію нейтрофілів отримували за допомогою центрифугування на подвійному градієнті щільності 1,077 і 1,093 фіколу-верографіну. Після 40 хв. центрифугування при температурі 4 С і швидкості 1500 об/хв. утворювалися дві інтерфази. Верхня інтерфаза (на межі плазма-верифікол щільністю 1,077) складалася із мононуклеарних клітин – 80 % лімфоцитів, 15-18 % моноцитів і незначного (2-3 %) додатка гранулоцитів. Нижня інтерфаза (на межі градієнтів розчинів щільністю 1,077-1,092) являла собою на 98-100 % популяцію нейтрофілів. Життєздатність клітин у тесті з трипановим синім складала 98-99 %. Аналіз зразків клітин для визначення АФК нейтрофілів проводився на проточному цитометрі Epics XL (“Beckman Coulter”, США) з допомогою 2,7-дигідродихлорфлюоресцеїн діацетату. Значення досліджуваного параметра виражали у відсот-

ках (інтенсивність світіння на клітину). Основні показники газового складу артеріальної крові визначали аналізатором кислотно-лужної рівноваги і електролітів крові ЭЦ-60 Э (Скверті-Мед, Росія): рН, рO₂, рСО₂, рO₂/FiO₂. Кров для дослідження забирали гепаринізованим шприцом з лівого шлуночка серця тварин власним методом [2].

Кореляційний аналіз проводили між усіма досліджуваними показниками. Вираховували коефіцієнт лінійної кореляції (r) та його достовірність (p), що відповідним чином позначалося у таблицях (кореляційних матрицях). Якщо показник r=0, зв'язок вважався відсутнім, у діапазоні 0–0,3 – свідчив про слабку кореляцію, проміжок показника 0,3–0,7 характеризував зв'язок середньої сили, а інтервал 0,7–1,0 вказував на значну кореляційну взаємодію. Коефіцієнт кореляції оцінювали як достовірний при p<0,05.

Результати досліджень та їх обговорення. Важливим є те, що АФК при легеневої патології утворюються особливо інтенсивно при вихідній гіпоксії та запальній реакції, залежно від протікання захворювання [5]. Проведений корелятивний аналіз показав, що рівень активних форм кисню нейтрофілів плазми крові у щурів з модельованим ГУЛ мав високий негативний корелятивний зв'язок з рівнем рН артеріальної крові у 2-й та 3-й дослідних групах (p<0,05) (табл. 1).

Таблиця 1

Корелятивні зв'язки вмісту АФК у нейтрофілах крові щурів із рівнем лейкоцитів, нейтрофільних гранулоцитів та газовим складом крові при гострому ураженні легень

Дослідна група	Загальні лейкоцити	Нейтрофільні гранулоцити, %	Нейтрофільні гранулоцити, к-сть	рН	рO ₂ /FiO ₂
2	r = 0,54	r = 0,14	r = 0,53	r = -0,80*	r = -0,11
3	r = 0,56	r = -0,03	r = 0,51	r = -0,87*	r = -0,02
4	r = 0,48	r = -0,02	r = 0,30	r = -0,51	r = -0,07
5	r = 0,33	r = 0,1	r = -0,29	r = -0,11	r = -0,26

Примітка: * – вірогідність відмінностей коефіцієнтів кореляції – (p<0,05).

Надлишкове утворення іонів Н⁺ відбувається внаслідок накопичення недоокислених продуктів вуглеводневого і ліпідного обміну. Респіраторний ацидоз, що розвинувся, пригнічує метаболічні процеси й іонний транспорт, зумовлює внутрішньоклітинне накопичення вільних іонів Са²⁺, які опосередковано через активацію мембранних фосфоліпаз сприяють зростанню вільних жирних кислот і лізофосфатидів, що порушують структурну організацію білкових і ліпідних мембранних комплексів, у результаті чого підвищується інтенсивність перекисного окиснення ліпідів [6].

Проведений корелятивний аналіз даних БАЗ показав, що рівень активних форм кисню нейтрофілів БАЗ у щурів з модельованим ГУЛ мав сильний позитивний корелятивний зв'язок з кількістю лейкоцитів у 3-й, 4-й та 5-й експери-

ментальних групах та позитивний корелятивний зв'язок з абсолютною кількістю нейтрофілів у цих же дослідних групах. Оцінюючи отримані результати встановлено сильний негативний корелятивний зв'язок з рівнем рН крові у 2-й та 3-й експериментальних групах. Потрібно зауважити, що ацидоз зменшує спорідненість гемоглобіну з киснем, що суттєво посилює тканинну гіпоксію. Особливої уваги заслуговує взаємозв'язок АФК нейтрофілів та газовим складом крові. Протягом першої доби після моделювання шурам ГУЛ рівень АФК в нейтрофілах тісно негативно корелював з рO₂/FiO₂ (табл. 2). Гіпоксія займає провідне місце в стимуляції реакцій вільнорадикального окиснення [10]. Підвищення метаболізму, що виникає при гіпоксії зумовлює зростання рівня АФК.

Корелятивні зв'язки вмісту АФК у нейтрофілах бронхоальвеолярного змиву щурів із рівнем лейкоцитів, нейтрофільних гранулоцитів та газовим складом крові при гострому ураженні легень

Дослідна група	Загальні лейкоцити	Нейтрофільні гранулоцити, %	Нейтрофільні гранулоцити, к-сть	pH	pO ₂ /FiO ₂
2	r=0,54	r=-0,10	r=0,57	r=-0,81*	r=-0,76*
3	r=0,82*	r=0,27	r=0,71*	r=-0,76*	r=-0,78*
4	r=0,75*	r=-0,15	r=0,70*	r=-0,48	r=-0,89*
5	r=0,87*	r=0,43	r=0,76*	r=-0,16	r=-0,74*

Примітка: * – вірогідність відмінностей коефіцієнтів кореляції – ($p < 0,05$).

Привертає увагу відмінність корелятивних зв'язків у крові та БАЗ, що, напевно, обумовлене більш вираженими патологічними змінами на місцевому рівні. Так, рівень загальних лейкоцитів, як і абсолютна кількість нейтрофільних гранулоцитів, позитивно корелювали в БАЗ, тоді як у плазмі крові не встановлено взаємозв'язку між АФК та білими кров'яними тільцями. Отримані результати вказують на те, що в міру прогресування ГУЛ зменшується клітинність крові, тоді як у БАЗ зростає рівень лейкоцитів, в основному за рахунок нейтрофілів. Це може бути обумовлене тим, що при дії патологічного чинника (гідрохлоридної кислоти) відбувається перерозподіл нейтрофілів у перші години ураження в пошкоджені легені. Внаслідок цього в периферичній крові має місце зниження нейтрофілів, що обумовлює зниження метаболічного резерву нейтрофілів периферичної крові. Це збігається з сучасними уявленнями про участь нейтрофілів у пусковому механізмі розвитку даного патологічного стану [12]. Накопичення активованих нейтрофілів у капілярній сітці альвеол та адгезія їх до ендотелію супроводжується генерацією АФК, що приводить до окисного стресу, наслідком якого є руйнування структурних елементів

альвеол. Тому, в міру зростання нейтрофільних гранулоцитів у БАЗ підвищується рівень АФК ($p < 0,05$). В цих умовах у легенях підвищується внутрішньосудинне зсідання крові та порушується регіонарна мікроциркуляція, що призводить до прогресивного зростання нейтрофільних гранулоцитів у БАЗ [3]. Звертає на себе увагу також сильний взаємозв'язок між АФК в БАЗ та індексом оксигенації. Це, можливо, пов'язано з патогенетичними механізмами тканинної гіпоксії і потребує наступного дослідження.

Висновки. 1. При експериментальному гострому ураженні легень, індукованому інтратрахеальним введенням гідрохлоридної кислоти встановлено сильний негативний корелятивний зв'язок активних форм кисню в нейтрофілах крові з рівнем pH крові у 2-ій та 3-ій експериментальних групах.

2. При HCl-індукованому гострому ураженні легень у бронхоальвеолярному змиві рівень активних форм кисню в нейтрофілах корелював з кількістю лейкоцитів та нейтрофільних гранулоцитів на 6, 12 і 24 години експерименту (прямий зв'язок), рівнем pH крові через 2 та 6 годин досліду та з pO₂/FiO₂ протягом часу спостереження (обернений зв'язок).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Марущак М. І. Зміни газового складу крові при експериментальному гострому ураженні легень у динаміці / М. І. Марущак // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. — 2011. — № 1. — С. 75—78.
2. Пат. 63892U, МПК А61В 17/00. Спосіб відбору крові в експерименті у щурів / Гудима А. А., Доброродній А. В., Марущак М. І. [та ін.] — № у 2011 03185 ; заявл. 18.03.11 ; опубл. 25.10.11, Бюл. № 20.
3. Патогенетична роль нейтрофільних гранулоцитів у розвитку гострого ураження легень / А. А. Гудима, М. І. Марущак, Г. Г. Габор, М. І. Куліцька // Буковинський медичний вісник. — 2011. — № 3. — С. 82—86.
4. Airway pressures, tidal volumes, and mortality in patients with acute respiratory distress syndrome / N. D. Ferguson, F. Frutos-Vivar, A. Esteban [et al.] // Crit. Care Med. — 2005. — Vol. 33. — P. 21—30.
5. Alvar G. N. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease / G. N. A. Alvar // Proc. Am. Thorac. Soc. — 2005. — Vol. 2. — P. 4367—4370.
6. Behmanesh S. Mechanisms of endothelial cell swelling from lactic acidosis studied in vitro / S. Behmanesh, O. Kempinski // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2000. — Vol. 279, № 4. — P. 1512—1517.
7. Gattinoni L. Assessing gas exchange in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome: diagnostic techniques and prognostic relevance / L. Gattinoni, E. Carless, M. Cresson // Current Opinion in Critical Care. — 2011. — Vol. 17. — P. 18—23.
8. Kubes P. The complexities of leukocyte recruitment / P. Kubes // Semin. Immunol. — 2002. — Vol. 14. — P. 65—72.
9. 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.
10. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury / J. D. Lang, P. J. McArdle, P. J. O'Reilly, S. Matalon // Chest. — 2002. — Vol. 122 (6 Suppl). — P. 314—320.
11. Plasma receptor for advanced glycation end products and clinical outcomes in acute lung injury / C. S. Calfee, L. B. Ware, M. D. Eisner, P. E. Parsons // Thorax. — 2008. — Vol. 63. — P. 1083—1089.

12. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury / J. Reutershan, A. Basit, E. V. Galkina, K. Ley // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* — 2005. — Vol. 289, № 5. — P. 807—815.
13. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury // *N. Engl. J. Med.* — 2006. — Vol. 354. — P. 2564—2575.
14. The specific free radical scavenger edaravone suppresses bleomycin-induced acute pulmonary injury in rabbits / T. Asai, Y. Ohno, S. Minatoguchi [et al.] // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* — 2007. — Vol. 34. — P. 22—26.

M.I. MARUSHCHAK

Horbachevsky Ternopil State Medical University, Medical Faculty, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Ternopil

THE LEVEL OF CORRELATION BETWEEN REACTIVE OXYGEN SPECIES, NEUTROPHILS CONTENT AND BLOOD GASES IN EXPERIMENTAL ACUTE LUNG INJURY

The comparative analysis of correlations between the level of reactive oxygen species in blood and bronchoalveolar lavage and neutrophils content and blood gases composition were examined. In HCl-induced acute lung injury negative correlative relationship between reactive oxygen species in neutrophils levels and pH levels in 2 and 3 experimental groups were found. In bronchoalveolar lavage the level of reactive oxygen species in neutrophils was correlated with the number of leukocytes and neutrophils after 6, 12 and 24 hours of the experiment (positive correlation), with the level of blood pH after 2 and 6 hours of the experiment and with pO₂/FIO₂ during observation time (negative correlation).

Key words: acute lung injury, reactive oxygen species, neutrophils, blood gases

Стаття надійшла до редакції: 24.02.2012 р.