

УДК 616.24+616-008.835+616.38-002

© М.Р. Герасимчук, Л.М. Заяць, 2012.

НОВІ ПОГЛЯДИ НА ОЦІНКУ ГОСТРОГО ЛЕГЕНЕВОГО УШКОДЖЕННЯ НА ФОНІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПЕРИТОНІТУ

М.Р. Герасимчук, Л.М. Заяць

ДВНЗ "Івано-Франківський національний медичний університет", кафедра патофізіології (зав. – д.м.н., проф. Л.М. Заяць), м. Івано-Франківськ.

NEW VIEWS ON THE ACUTE LUNG INJURY APPRAISAL IN EXPERIMENTAL PERITONITIS
M.R. Gerasymchuk, L.M. Zayats

SUMMARY

In experiments on white Wistar male rats, determined that leukocytic sequestration is a major pathogenetic mechanisms of acute lung injury in case of acute diffuse peritonitis. Determined that coefficient, proposed by us, for the regulation of pulmonary leukocytes is a sensitive marker of lung injury, which was also confirmed by Wet/Dry indexes in the early stages of research.

НОВЫЕ ВЗГЛЯДЫ НА ОЦЕНКУ ОСТРОГО ЛЕГОЧНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПЕРИТОНИТЕ

М.Р. Герасимчук, Л.М. Заяць

РЕЗЮМЕ

В опытах на белых крысах-самцах линии Вистар определено, что лейкоцитарная секвестрация есть одним из основных патогенетических механизмов на пути прогрессирования развития острого легочного повреждения при остром разлитом перитоните. Установлено, что предложенный нами коэффициент легочной регуляции по лейкоцитам выступает чувствительным маркером легочного повреждения, что было подтверждено также Wet/Dry индексами уже на первых этапах исследования.

Ключові слова: гостре легеневе ушкодження, лейкоцити, перитоніт.

Розвиток одного з найбільш важких станів у практиці хірургії та інтенсивної терапії – синдрому гострого ушкодження легень (СГУЛ), частота якого, за даними американських вчених, складає 0,6 на 1000 населення, без видимих тенденцій до зниження його виникнення, а летальність залишається високою – більш ніж 50%, і не має тенденції до зниження [14]. Цей факт свідчить про недостатні знання та розуміння механізмів розвитку СГУЛ.

За умов розвитку інфекційного процесу в абдомінальній порожнині та міграції внутрішньокішкових бактерій і токсичних продуктів з просвіту кишечника у кровообіг виникає бактеріотоксемія [5]. Легеневі гемокапіляри стають першою ланкою для медіаторів та ендотоксинів. У результаті легень є першим органом на шляху детоксикації вищезгаданих факторів, функція якого декомпенсується. Як наслідок, відбувається активація імунокомпетентних клітин, що супроводжується «респіраторним вибухом» і викидом великої кількості медіаторів запалення [1, 9]. Все це приводить до зростання ендотеліальної проникності легневих гемокапілярів, порушуються респіраторні і нереспіраторні функції легень, і як наслідок, відбуваються вагомні зрушення у легневій гемодинаміці [13].

Відповідно до вищезазначених фактів нами було поставлено за мету встановити простий метод оцінки гострого легеневого ушкодження при експериментальному перитоніті.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

Дослідження проводилось на 78 білих щурах-самцях лінії Вистар масою 180-230 г, які були розділені на 3 групи: I-а інтактна [3], II-а контрольна група тварин, яким вводили еквівалентну дозу фізіологічного розчину та III-я – дослідна група тварин із відтвореним гострим розлитим перитонітом (ГРП) за допомогою внутрішньоочеревинного введення 10% калової суспензії з розрахунку 1 мл на 100 г маси щура. Всі дослідження проводили під загальним знечуленням, з використанням кетаміну (40 мг/кг). Утримання тварин та маніпуляції проводилися у відповідності до положень Закону України «Про захист тварин від жорстокого відношення» (N 1759-VI від 15.12.2009) та Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин.

Функціональну активність легень оцінювали за запропонованим нами коефіцієнтом легеневої регуляції за лейкоцитами у відсотках (КЛРл), – отримано позитивне рішення на заявку патенту на корисну модель № u 2012 00810. $КЛРл = (B-A)/B \times 100$, де B – кількість лейкоцитів у венозній крові, A – кількість лейкоцитів в артеріальній крові [2], а також різницю між білокрівцями у венозній (Лв) та артеріальній (Ла) крові. Забір крові для дослідження у тварин здійснювали через 1, 12, 24 та 48 год від початку моделювання перитоніту з лівого

(артеріальна) та прового (венозну) шлуночків.

Ступінь ендотоксикозу розраховували за лейкоцитарним індексом інтоксикації (ЛІІ) за формулою Я.Я. Кальф-Каліфа (1938). ЛІІ є показником процесів тканинної деградації і рівня ендогенної інтоксикації, зростання якого вказує на підвищення рівня останньої та активації процесів розпаду.

Для оцінки розвитку легеневого набряку нами використано Wet/Dry індекси [15], які підвищуються при накопиченні позасудинної рідини в легенях, об'єму циркулюючої крові або обох одночасно. Ми використовували ліву легеню, яку після виділення з грудної клітки, швидко промивали фізіологічним розчином, усували зайву вологу фільтрувальним папером і зважували з метою визначення її вологості (Wet_m) маси. Потім препарат перекладали на фольгу та залишали протягом 24 год у термостаті при температурі 80 °С, опісля визначали масу сухої (Dry_m) легені. Нами розраховано наступні індекси: 1) співвідношення маси вологості (Wet_m) легені до маси тіла тварини (B_m), що репрезентує розвиток набряку легеневої тканини (НЛТ): $НЛТ = (Wet_m / B_m) * 10,000$; 2) співвідношення маси сухої (Dry_m) легені до маси тіла тварини (B_m), що оцінює утворення легеневого ексудату (ЛЕ): $ЛЕ = (Dry_m / B_m) * 10,000$; 3) вміст води в легенях розраховували за формулою: $ВЛ = (Wet_m - Dry_m) / Wet_m * 100$; 4) співвідношення маси вологості до маси сухої легені (ВСЛ) є гравіметричним вимірюванням кількісного індексу рівня легеневого набряку: $ВСЛ = Wet_m / Dry_m$.

Статистичну обробку матеріалу проводили на персональному комп'ютері з використанням пакетів прикладних програм для статистичного аналізу "StatSoft/ Statistica 6.0". Аналіз динаміки показників в кожній групі проводили за допомогою парного критерію Вілкоксона, призначеного для дослідження значущості відмінностей в зв'язаних вибірках. При проведенні статистичної обробки обчислювали середню арифметичну величину (M), вірогідність різниць результатів дослідження (P). Кореляційні зв'язки між вивченими показниками вираховували за допомогою Spearman Rank Order Correlations (r). Результати вважалися вірогідними, якщо коефіцієнт вірогідності був меншим, або дорівнював 0,05, що є загальноприйнятим у медико-біологічних дослідженнях.

РЕЗУЛЬТАТИ І ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Досліджуючи функціональні особливості легень за умов ГРП в експерименті, нами було використано комплексний підхід у вивченні механізмів респіраторного ушкодження, а надалі й підтвердження його розвитку.

Значимість нейтрофільних гранулоцитів (НГ) в захисті організму від інфекцій чітко доведена [4]. Однак, НГ є не тільки ефекторними клітинами – вони

мають виражену регуляторну функцію і здатні суттєво впливати на інші клітини крові, ендотелій, ферментні системи плазми, швидко реагувати на подразнюючі фактори, першими включаються в запальний процес та обумовлюють пускові механізми розвитку запалення і ранні захисні реакції; їхня властивість протягом кількох хвилин розвивати метаболічні процеси, котрі приводять до "респіраторного вибуху", дозволяє ефективно нейтралізувати та елімінувати патоген. Це визначає роль НГ як маркерів гомеостазу.

Для підтвердження припущень про активну участь лейкоцитів у процесах ендогенної інтоксикації ми визначили ЛІІ (табл. 1). На першу годину експерименту були зафіксовані наступні зміни: лейкоцитарний індекс інтоксикації зріс у 2 рази ($p < 0,01$). З II етапу і до завершення дослідження ЛІІ продовжував прогресивно наростати, досягнувши рівня $2,46 \pm 0,33$ ($p < 0,03$), що в 11,7 рази перевищувало контрольні дані. Такі результати можуть вказувати на надмірне залучення лейкоцитів, зокрема нейтрофілів у запальний процес, їхню значну загибель, та як результат амортизаційних втрат, сприяючи паралельно росту ендогенної, що є притаманним для гострої запальної реакції та розвитку критичного стану організму.

У результаті визначення КЛРл, стало відомо, що одним з ключових і, можливо, переломних моментів у розвитку гострого легеневого ушкодження при розлитому перитоніті є значна затримка лейкоцитів у легенях з подальшою їх агресією щодо "організмів", яким виступає мікроциркуляторне русло легень [7]. Співзвучні нашим твердженням, виступають публікації й ряду інших вчених, котрі представляють у якості основного патогенетичного чинника нейтрофіл-залежне ушкодження. Так, у активованих ендотоксином нейтрофілоцитах практично втрачається властивість деформуватися за рахунок полімеризації F-актинової облямівки. Актинові філаменти перерозподіляються з центральних та перинуклеарних ділянок у периферичні у відповідь на вплив хемоатрактантів, формуючи актинові стресорні волокна, ламеліподії, філоподії, гофруються. Враховуючи те, що розміри нейтрофілоцитів значно перевищують еритроцитарні, і навіть, за звичайних умов їхнє пересування по легневих гемокапілярах значно повільніше. Так, відеомікроскопічні дослідження показали, що для транзиту нейтрофілів через мікроциркуляторне русло необхідна медіана часу від 26 с, середній час 6,1 сек, коли за аналогічних умов час проходження червоних кров'яних тілець становить від 1,4 до 4,2 сек [11]. Чим довше часу, необхідно нейтрофілам, щоб пройти через мікросудини, тим підвищується їхня концентрація в них. Діаметр активованого сферичного нейтрофіла (6-8 мкм) перевищує діаметр більшості сегментів

Таблиця 1

Динаміка показників легеневої регуляції за лейкоцитами та інтоксикації у білих щурів

Показник	Інтактні тварини, n=10	Контрольні тварини, n=10	Тварини з експериментальним перитонітом			
			1 год, n=10	12 год, n=9	24 год, n=8	48 год, n=7
Кількість лейкоцитів у вен. крові (*10 ⁹ /л)	6,17±0,41	6,26±0,41	9,73±0,81*	13,90±0,89*#	5,26±0,58*#	9,26±0,74*#
Кількість лейкоцитів у арт. крові (*10 ⁹ /л)	6,11±0,40	6,16±0,44	8,59±0,77*	10,89±0,64*#	3,74±0,53*#	5,91±0,68*#
КЛРл, %	1,04±0,78	1,62±0,99	11,74±2,94*	21,63±2,48*#	29,00±3,64*#	36,22±3,44*#
Різниця лейкоцитів у вен. та арт. крові (*10 ⁹ /л)	0,06±0,05	0,10±0,06	1,14±0,29*	3,01±0,45*#	1,51±0,18*#	3,34±0,30*
ЛПІ	0,18±0,03	0,21±0,04	0,42±0,02*	0,91±0,18*#	1,70±0,21*#	2,46±0,33*#

Примітки: 1. * – вірогідність розходження даного етапу дослідження з контролем, $p < 0,05$; 2. # – вірогідність розходження даного етапу дослідження з попереднім, $p < 0,05$.

капілярів (2-15 мкм), що потребує від НГ зміни форми для подальшого пересування [8]. Очевидно, стає зрозумілим механізм масивної лейкоцитарної секвестрації. Остання сприяє генералізованій продукції НГ агресивних медіаторів запалення, які не витрачаючи часу “на роздуми” одразу реалізують свої руйнівні ефекти у навколишньому середовищі. Така картина збігається з дослідженнями вчених [12], які спростували припущення про залежність посиленої нейтрофільної секвестрації при пневмонії від CD11/CD18 опосередкованої адгезії, експресії НГ великої чи малої кількості L-селектинів. Окрім того, акумуляція поліморфноядерних лейкоцитів у легенях прямо залежить від зростання експресії ICAM-1, VCAM-1. Автори все більше схиляються до думки, про зниження деформуючої здатності за рахунок змін у цитоскелеті нейтрофілоцитів, які опиняються ніби в “легеневій пастці”, а також висловлюють припущення, що аналогічні механізми лейкоцитарної затримки притаманні для гострого легеневого ушкодження, на що також вказує у своїх роботах Ященко Ю.Б. (2006) [6].

Так, розроблений нами КЛРл виявився досить чутливим уже з першого етапу дослідження, свідченням чого є зростання даного показника, порівняно з контролем, у 7,3 рази у групі тварин з ГРП. За даними Е. Abraham та співавт. (2000), навіть за умов нейтропенії відбувається стимуляція транскрипційного регуляторного фактору NF-κB [10]. Це веде до зростання mRNA та білків, IL-1β, MIP-2, TNF-α, що ініціює гостру запальну відповідь,

лейкоцитарну секвестрацію уже через 15-30 хв від початку дії ендотоксину, та спричинює легенеve ушкодження.

На 12-ту год дослідження спостерігали наростання лейкоцитозу із збільшенням показника лейкоцитарної різниці у 2,6 рази ($p < 0,01$) порівняно з таким на попередньому етапі. Така ж тенденція була і для КЛРл, який становив 21,63±2,48 % ($p < 0,01$), перевищуючи над контрольними даними у 13,4 рази. Хоча для III-го етапу дослідження і було характерне зменшення рівня лейкоцитів та показника їхньої різниці на 49,83 %. Звертає на себе також увагу й те, що КЛРл відображав стан лейкоцитарної затримки у легенях на фоні лейкопенії, що спостерігалось на 24 год дослідження у щурів III групи, перевищуючи показники групи порівня у 17,9 рази [2].

Зазначені зміни, на нашу думку, свідчать на користь затримки лейкоцитів в легневих капілярах, їхню підвищену секвестрацію. Така ж тенденція зберігалась з продовженням тривалості експерименту. Так, на 48-му год реактивно збільшувалась кількість білих кров'яних тілець, паралельно з якою, у 2,2 рази зросла різниця між Лв та Ла. КЛРл й надалі прогресував, досягнувши рівня 36,22±3,44 %, що підтверджує наші припущення про підвищену секвестрацію лейкоцитів у легенях щурів з ГРП, а це в свою чергу сприяє прогресуванню легеневого ушкодження.

Отримані результати свідчать на користь наших припущень про нейтрофільне ушкодження легень та його роль у розвитку гострого легеневого

Таблиця 2

Динаміка показників Wet/Dry легневих індексів у білих щурів з гострим розлитим перитонітом

Показ- ник	Інтактні тварини, n=10	Контроль- ні тварини, n=10	Тварини з експериментальним перитонітом			
			1 год, n=10	12 год, n=9	24 год, n=8	48 год, n=7
НЛТ	37107,4 0±1384, 0	38759,39 ±2055,5	45065,82± 5049,5*	45598,60± 3455,8*	59182,07± 4207,4*#	72224,30± 4617,5*#
ЛЕ	13746,3 3± 711,9	13732,38 ±868,1	14618,57± 1429,6*	14836,30± 894,0*	16575,51± 1557,3*#	19989,70± 1291,0*#
ВЛ	62,95± 1,42	64,50± 2,60	67,48±1,60	67,40± 1,57*	71,96± 2,14*#	72,29± 1,32*
ВСЛ	2,70± 0,11	2,83± 0,23	3,08±0,15	3,07±0,15 *	3,59± 0,28*#	3,62±0,18*

Примітки: 1. * – вірогідність розходження даного етапу дослідження з контролем, $p < 0,05$; 2. # – вірогідність розходження даного етапу дослідження з попереднім, $p < 0,05$.

ушкодження. Окрім цього, літературний аналіз та результати КЛРл, навели нас на доцільність встановлення інших аргументуючих проявів даної патології. Серед них, безумовно, безкомпромісним є формування набряку легень та накопичення ексудату, що веде до стійкого порушення легеневого кровообігу, газообміну та гіпоксії. У вирішенні поставленого завдання нам стали в пригоді Wet/Dry індекси, за допомогою яких ми встановили рівень набряку легеневої тканини (НЛТ), утворення легеневого ексудату (ЛЕ), вміст води в легенях (ВЛ), а також розраховували гравіметричне вимірювання кількісного індексу факту легеневого набряку,

співвідношенням маси вологої до маси сухої легені (ВСЛ). Після аналізу отриманих результатів, дані представлено в таблиці 2, можемо з впевненістю сказати, що всі індекси достовірно зростали ($p < 0,01$) з 12 год дослідження із максимальним значенням на 48 год експерименту. Зокрема, НЛТ перевищував контрольні дані у 1,9 рази, ЛЕ – 1,5, ВЛ – 10,78 %, а ВСЛ – 21,82 %. Такі дані яскраво засвідчують формування СГУЛ, за рахунок впливу ЕІ та НГ, з подальшим прогресуючим розвитком набряку легеневої тканини та накопиченням ексудативної рідини, і як наслідок, формування дихальної недостатності.

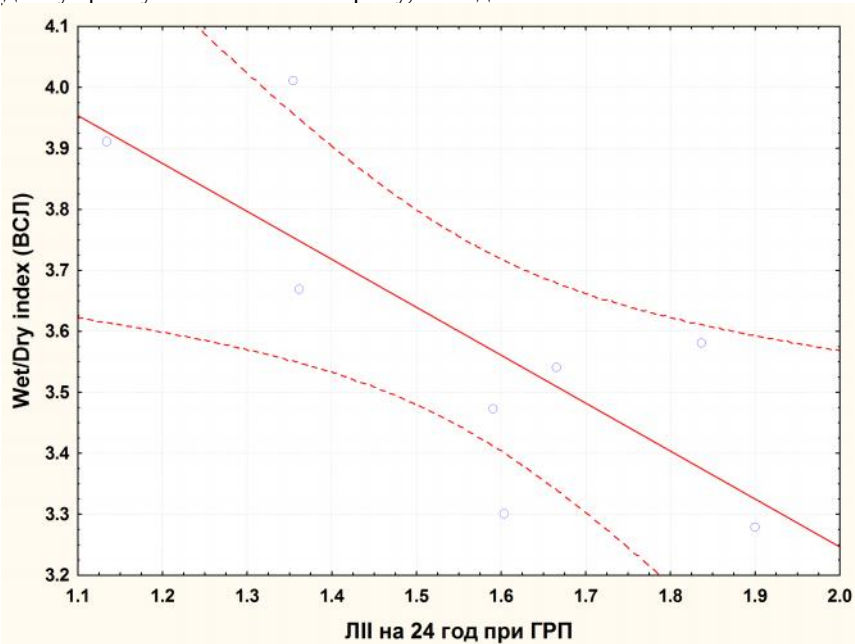


Рис. 1. Діаграма розсіювання при ГРП у III групі щурів між показником Wet/Dry індексом ВСЛ та КЛРл на 24 год експерименту (Spearman Rank Order Correlations)

Провівши кореляційний аналіз між показниками ЛШ та Wet/Dry (ВСЛ) на третьому етапі дослідження (рис. 1) нами знайдено стійкий сильний негативний зв'язок ($r_{xy} = -0,81$). Крім того, на 48 год встановлено (рис. 2) сильний позитивний між показником Wet/Dry набряку легень (НЛТ) та КЛРл, ($r_{xy} = 0,79$). Утворені взаємозв'язки, на нашу думку, демонструють значний вплив як самих лейкоцитів, так

і їхніх біологічно-активних речовин, продуктів розпаду, які виділяються в результаті лейкоцитарної секвестрації в легеневій тканині, у свою чергу призводять до ушкодження респіраторного апарату. Так, чітко встановлена залежність між ЛШ, КЛЛ та розвитком набряку в легеневій тканині, що є однією з ключових ознак СГУЛ.

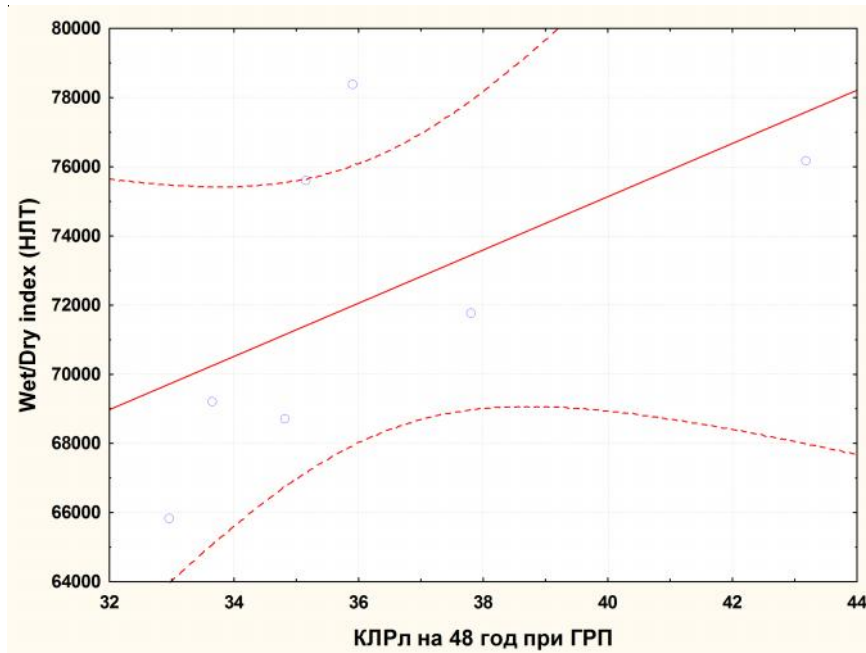


Рис. 2. Діаграма розсіювання при ГРП у III групі щурів між показником Wet/Dry індексом НЛТ та КЛРл на 48 год (Spearman Rank Order Correlations)

Отже, отримані нами результати є прогностично несприятливими та свідчать про неконтрольовану затримку білих кров'яних тілець і відповідно репрезентують прогресуючий розвиток гострого легеневого ушкодження при експериментальному перитоніті.

ВИСНОВКИ

1. Підвищена нейтрофільна секвестрація є одним з основних патогенетичних механізмів на шляху прогресування розвитку гострого легеневого ушкодження.

2. Коефіцієнт легеневої регуляції за лейкоцитами є простим показником, який може зайняти повноцінне місце у клінічній практиці, оскільки чітко відображає реальну картину прогресування патологічного процесу в легенях ще на доклінічному етапі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Агаман О.В. Запалення: Навчальний посібник. – Суми: Вид-во СумДУ, 2006. - 66 с.

2. Герасимчук М.Р. Состояние клеточных механизмов защиты лёгких при остром разлитом перитоните и антиоксидантной коррекции в

эксперименте / М.Р. Герасимчук // Материалы 66-й Итоговой науч. конф. молодых учёных РостГМУ с междунар. участием, 20 апреля 2012. – Ростов, Российская Федерация : РостГМУ, 2012. – С. 339 – 340.

3. Герасимчук І. Є. Особливості динаміки морфофункціональних змін у судинному руслі печінки та нирок при перебігу гострого розлитого перитоніту в експерименті / І. Є. Герасимчук, А. В. Гантімуров, В. О. Чепесюк // Вісник морфології. – 2010. – № 16(1). – С.125–128.

4. Изменения иммунологических и цитометрических характеристик нейтрофильных гранулоцитов крови под влиянием МНФ К "G" у больных туберкулезом легких / И.В. Гомоляко, Е.Ф. Чернушенко, В.М. Петишкіна [и др.] // Лабораторная диагностика. – 2009. – № 3 (49). – С. 13–18.

5. Сидоренко С. В. Микробиологическая структура перитонита / С. В. Сидоренко, Б. К. Шуркалин, Т. В. Попов, В. И. Карабак // Инфекции в хирургии. – 2007. – № 1. – С. 15–17.

6. Ященко Ю. Б. Метаболіти оксиду азота в плазмі крові новонароджених, як діагностичний маркер ендотеліальної дисфункції при розвитку гострого

пошкодження легень / Ю. Б. Ященко, Л. В. Ященко // Клінічна та експериментальна патологія. – 2006. – Т. V, № 2. – С. 99–103.

7. Ященко Ю. Б. Патогенетична участь нейтрофільних гранулоцитів крові у розвиток гострого ушкодження легень у новонароджених при критичних станах / Ю. Б. Ященко // Одеський медичний журнал. – 2005. – № 3 (89). – С. 79–81.

8. Alan R. Burns Unique Structural Features That Influence Neutrophil Emigration Into the Lung / Alan R. Burns, C. Wayne Smith, David C. Walker // *Physiol. Rev.* – 2003. – № 83. – P. 309–336.

9. Differential effects of antibiotics in combination with G-CSF on survival and polymorphonuclear granulocyte cell functions in septic rats / Artur Bauhofer, Markus Huttel, Wilfried Lorenz [et al.] // *BMC Infectious Diseases* 2008. – № 8. – P. 55–65.

10. Edward Abraham Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury / Edward Abraham, Aaron Carmody, Robert Shenkar, John Arcaroli // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol Biol.* – 2000. – № 279. – P. 1137–1145.

11. Jürg Reutershan Bench-to bedside review: Acute respiratory distress syndrome – how neutrophils migrate into the lung / Jürg Reutershan, Klaus Ley // *Critical Care.* – 2004. – № 8. – P. 453–461.

12. Kazuo Yoshida Neutrophil Cytoskeletal Rearrangements during Capillary Sequestration in Bacterial Pneumonia in Rats / Kazuo Yoshida, Ryoichi Kondo, Qin Wang, Claire M. Doerschuk // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2006. – Vol 174. – P. 689–698.

13. Luiz F. Poli-de-Figueiredo. Experimental Models Of Sepsis And Their Clinical Relevance / Luiz F. Poli-de-Figueiredo, Alejandra G. Garrido, Naomi Nakagawa, Paulina Sannomiya // *SHOCK.* – 2008. – Vol. 30, Suppl. 1. – P. 53–59.

14. Luh Shi-ping. Acute lung injury/acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS): the mechanism, present strategies and future perspectives of therapies / Luh Shi-ping, Chiang Chi-huei // *Journal of Zhejiang University Science B.* – 2007. – № 8 (1). – P. 60–69.

15. Suppression of perfluorobutylene induced ALI by pretreatment with pyrrolidine dithiocarbamate / Jian Zhao [et al.] // *J. Occup. Health.* – 2007. – № 49. – P. 95–103.