

УДК [616-002.2:577.114.4]-085.273-07:616.15-076:612.112.3

А.Н. Шевченко, В.А. Бибиченко

Харьковский национальный медицинский университет

ВЫРАЖЕННОСТЬ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ РЕАКЦИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ КАРАГИНЕНОВОМ ВТОРИЧНО ХРОНИЧЕСКОМ ВОСПАЛЕНИИ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ ГЛЮКОЗАМИНИЛМУРАМИЛДИПЕПТИДА

В эксперименте на крысах показано, что при воспалении на фоне применения глюкозаминилмурамилдипептида по сравнению с естественным течением процесса в начальные сроки количество лейкоцитов в периферической крови больше, а в более отдаленные сроки – меньше. Усиление лейкоцитарной реакции в начальные сроки воспаления приводит к более эффективной элиминации карагинена и снижению хронизации воспаления, с чем связана сниженная потребность в лейкоцитах в период хронизации. Следовательно, использование глюкозаминилмурамилдипептида приводит к снижению хронизации воспаления.

Ключевые слова: *карагиненовое вторично хроническое воспаление, периферическая кровь, лейкоциты, глюкозаминилмурамилдипептид.*

Воспаление, как типовой патологический процесс, является основой более 70 % известных заболеваний человека, поэтому составляет центральную и актуальную проблему медицины на протяжении всей ее истории. Особое значение имеет проблема затяжного (подострого, первично и вторично хронического) воспаления, поскольку оно характеризуется несоответствием между эволюционно-биологической защитно-приспособительной сущностью воспалительной реакции и ее пользой для конкретного организма. В связи с этим воспаление является вредным для организма, особенно при чрезмерно выраженном повреждении. С хроническим воспалением связано большинство патологических явлений при хронических инфекциях, метаболических и других болезнях. В то же время лечение хронического воспаления является чрезвычайно сложной проблемой [1].

Вместе с тем, эмиграция лейкоцитов с лейкоцитарной инфильтрацией ткани является главным признаком воспаления, поскольку лейкоциты служат основными клетками-эффекторами этого процесса, и система крови в целом, обеспечивающая возникновение и поддержание инфильтрации, играет решающую роль в реализации воспаления [2].

Из этого следует, что профилактика и лечение хронического воспаления возможны путем стимуляции гемопоэза, увеличения продукции функционально активных лейкоцитов. Показан положительный эффект в этом отношении рекомбинантного человеческого Г-КСФ (нейпогена), а также натрия нуклеината [3, 4]. Существенный интерес в качестве перспективного средства для профилактики и лечения хронического воспаления представляет глюкозаминилмурамилдипептид, который обладает способностью воздействовать на все популяции клеток иммунной системы (макрофаги, Т- и В-лимфоциты), но в первую очередь на моноцитарно-макрофагальное звено, дефект которого играет ключевую роль в патогенезе хронических инфекций. В этих клетках глюкозаминилмурамилдипептид усиливает поглощение и переваривание лизосомальных ферментов, цитотоксичность по отношению к вирусинфицированным клеткам, экспрессию HLA-DR-антигенов, синтез интерферона- γ , интерлейкина-1, фактора некроза опухоли, колониестимулирующих факторов и других цитокинов [5]. В то же время возможность применения глюкозаминилмурамилдипептида для профилактики хронического воспаления не изучалась.

© А.Н. Шевченко, В.А. Бибиченко, 2016

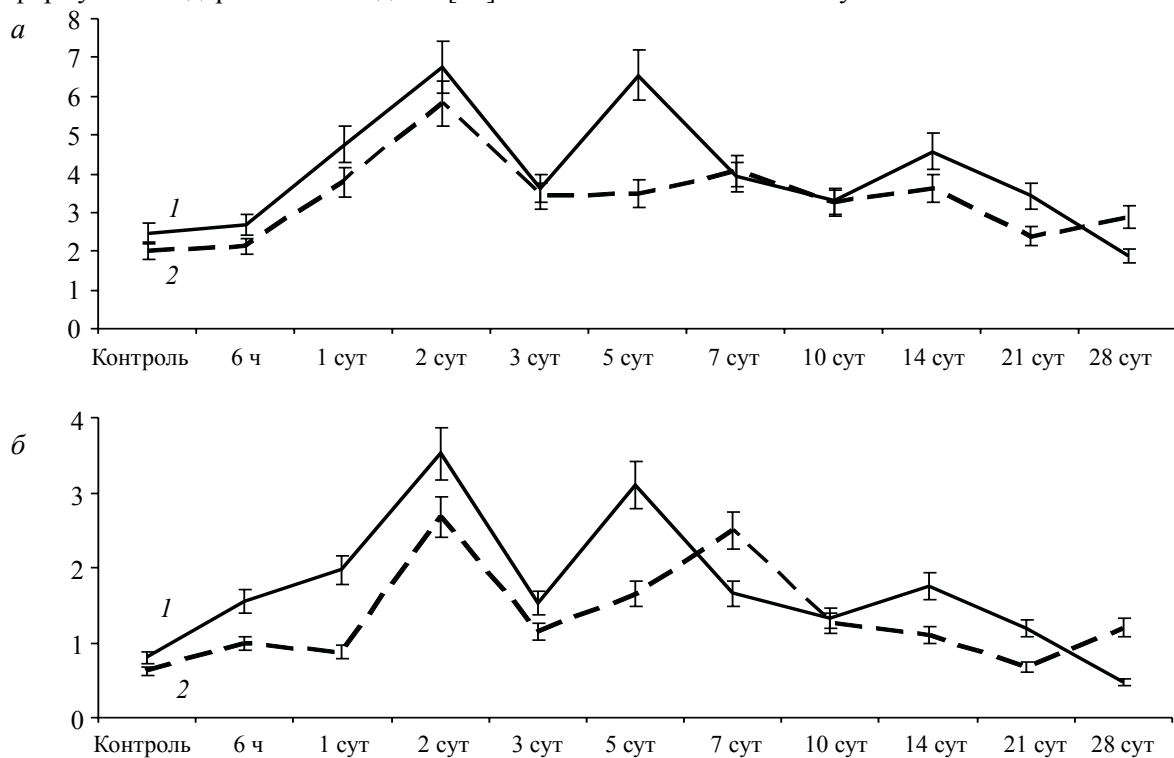
Целью исследования явилась оценка возможности влияния глюкозаминилмурамилдипептида на лейкоцитарную реакцию периферической крови при карагиненовом вторично хроническом воспалении в эксперименте.

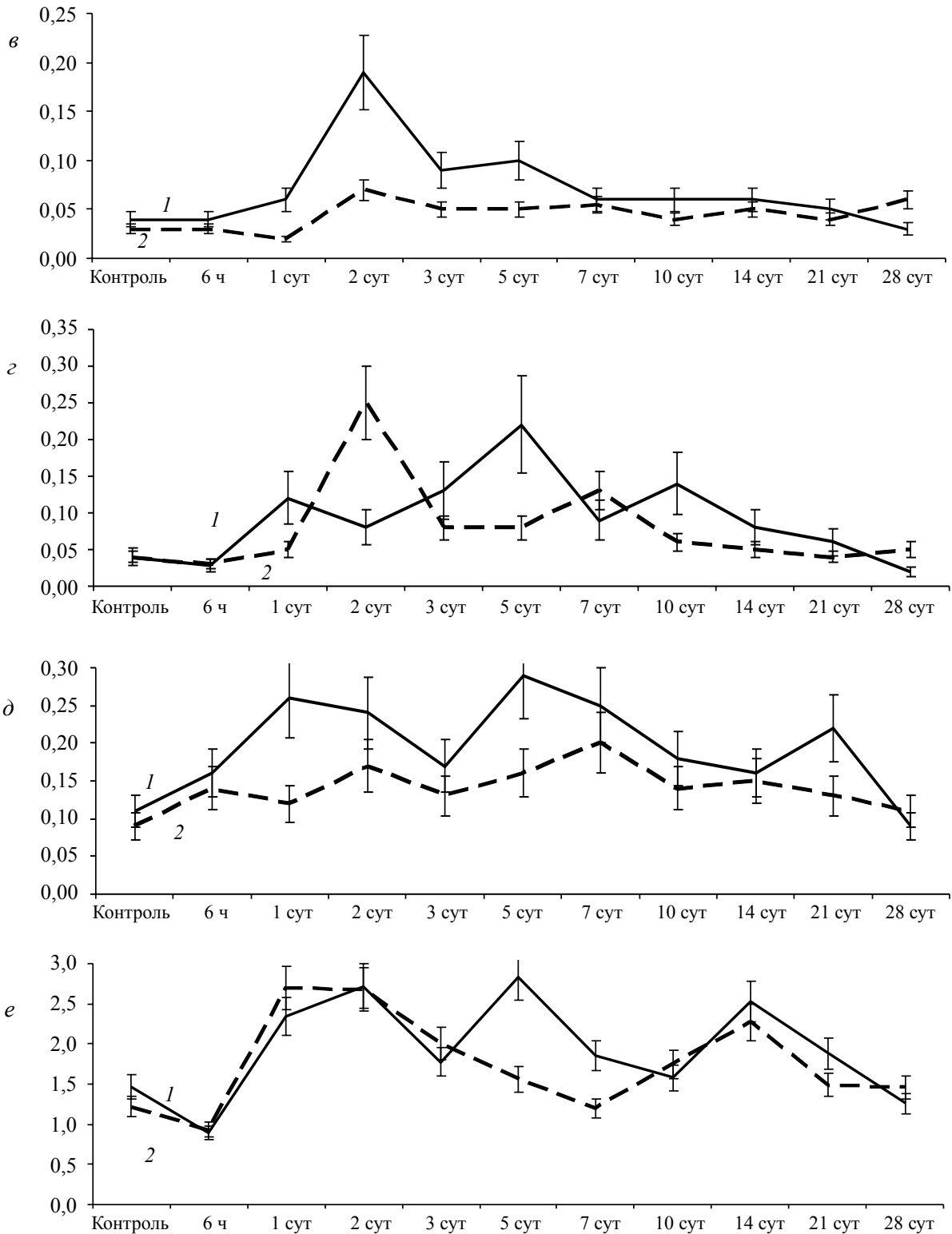
Материал и методы. Опыты проведены на 132 крысах-самцах линии Вистар массой тела 180–200 г. Вторично хроническое воспаление вызывали внутримышечным введением в область бедра 10 мг λ -карагинена (Sigma, США) в 1 мл изотонического раствора натрия хлорида [6, 7]. Глюкозаминилмурамилдипептид вводили под кожу спины крысам в дозе 0,1 мг в 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида ежедневно на протяжении всего эксперимента. Дозу для крыс определяли по константе биологической активности по формуле Рыболовлева [8, 9]. Контролем для естественного течения воспаления были интактные крысы, для воспаления на фоне применения глюкозаминилмурамилдипептида – крысы, которым вводили препарат без последующего вызывания воспаления. Животных забивали декапитацией под наркозом на 6-й час, 1-е, 2-е, 3-и, 5-е, 7-е, 10-е, 14-е, 21-е и 28-е сутки воспаления. Кровь забирали из хвостовой вены перед декапитацией. Лейкоцитарную реакцию крови изучали на основании определения общего количества лейкоцитов в крови и лейкоцитарной формулы стандартными методами [10].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. При естественном течении воспаления общее количество лейкоцитов в крови в динамике вторично хронического воспаления изменяется волнообразно: первая волна сопровождается достоверным повышением на 1-е – 2-е сутки; вторая – достоверным повышением на 5-е сутки; третья волна – достоверным повышением на 14-е сутки (рисунок).

В начале острого периода воспаления наиболее активно выходят в очаг циркулирующие в периферической крови лейкоциты. На 1-е – 2-е сутки интенсивность эмиграции снижается по сравнению с начальными сроками воспаления, кроме того, из костного мозга поступает больше лейкоцитов, образующихся вследствие активации кроветворения, так что для этого периода характерен лейкоцитоз. На 3-и сутки, по-видимому, устанавливается баланс между эмиграцией лейкоцитов и поступлением их из костного мозга. Второй пик лейкоцитоза на 5-е сутки, по-видимому, связан со снижением эмиграции, с одной стороны, с другой – с нарастанием гемопоэза в связи с развитием в это время гиперплазии костного мозга. Баланс между эмиграцией лейкоцитов и продукцией их в костном мозге устанавливается и на 7-е –





Общее количество лейкоцитов (а), содержание сегментоядерных нейтрофилов (б), палочкоядерных нейтрофилов (в), эозинофилов (г), моноцитов (д), лимфоцитов (е) в периферической крови в динамике карагиненового вторично хронического воспаления у крыс при естественном его течении (1) и на фоне применения глюкозаминилмурамиддипептида (2)

10-е сутки. Снижение содержания лейкоцитов на третий пик (14-е сутки) по сравнению с первыми двумя пиками, по-видимому, связано со снижением остроты процесса. Тенденция

к снижению количества лейкоцитов на 28-е сутки свидетельствует о повторном усилении эмиграции лейкоцитов в очаг, что указывает на хронизацию воспаления [2].

Таким образом, к 1-м суткам воспаления постепенно развивается лейкоцитоз, а в дальнейшем общее количество лейкоцитов изменяется волнообразно. Ко 2-м суткам наблюдается выраженный лейкоцитоз, что соответствует пику лейкоцитов. На 5-е, 7-е, 14-е сутки также наблюдается достоверное повышение общего количества лейкоцитов и сменяется восстановлением до исходного состояния на 21-е, 28-е сутки.

Лейкоцитоз на 1-е, 2-е сутки связан с активацией гемопоэза. Достоверное повышение на 5-е, 7-е сутки совпадает с периодом повторного усиления гемопоэза в связи с развитием гиперплазии костного мозга [11, 12]. Лейкоцитоз на 14-е сутки связан также с повторным усилением гемопоэза.

По сравнению с естественным течением воспаления общее количество лейкоцитов в крови при воспалении на фоне применения глюкозаминилмурамилдипептида достоверно меньше на 5-е сутки в 1,87 раза ($p < 0,001$) и на 14-е сутки в 1,26 раза ($p < 0,05$), достоверно больше на 28-е сутки в 1,54 раза ($p < 0,05$), а в остальные сроки статистически не отличается при весьма сходной динамике.

При воспалении на фоне применения глюкозаминилмурамилдипептида в отличие от естественного течения воспаления уменьшение общего количества лейкоцитов наблюдается на 5-е и 14-е сутки, что связано с усиленным выходом лейкоцитов в очаг воспаления. Вначале воспалительная реакция более выражена, чем при естественном течении воспаления, на 28-е сутки – меньше. Усиленное вовлечение лейкоцитов до 14-х суток, по-видимому, приводит к большей элиминации флогогена в этот период и снижению необходимости в лейкоцитах позже, в период хронизации воспаления, что свидетельствует об уменьшении хронизации, то есть о снижении глюкозаминилмурамилдипептидом хронизации воспаления.

При естественном течении воспаления на 6-й час обнаруживается нейтрофильный лейкоцитоз. Несмотря на интенсивную эмиграцию нейтрофилов в очаг, в этот период развивается нейтрофилез, который свидетельствует о преобладании поступления нейтрофилов из костного мозга в кровь над их эмиграцией из крови в очаг. Это, по-видимому, связано с усилением вымывания зрелых лейкоцитов из костномозгового постмитотического резервного пути, что обусловлено ускорением кровотока, в том числе в костном мозге, харак-

терным для воспаления. Это, в свою очередь, как и все системные проявления воспаления, вызывается воздействием цитокинов (ИЛ-1, ФНО- α и др.), усиленно продуцируемых активированными лейкоцитами очага и периферической крови [2, 11]. На 2-е сутки нейтрофилия достигает максимума, что соответствует периоду выраженной активации гемопоэза и достоверному максимальному повышению общего количества лейкоцитов.

Как видно, выраженный нейтрофилез удерживается до 5-х суток, что, по-видимому, объясняется гиперплазией костного мозга [11]. На 28-е сутки наблюдается достоверная нейтропения, что свидетельствует о повторной усиленной эмиграции нейтрофилов в очаг и соответствует хронизации воспаления.

При воспалении на фоне применения глюкозаминилмурамилдипептида достоверное снижение количества сегментоядерных нейтрофилов на 1-е, 5-е и 14-е сутки свидетельствует об усиленном их выходе из периферической крови в очаг, по-видимому, в связи с усилением поступления их из костного мозга в кровь и с гиперплазией костного мозга. Достоверное повышение их количества на 28-е сутки, по-видимому, свидетельствует о менее выраженной эмиграции в очаг, менее выраженном гемопоэзе в этот период в связи со снижением хронического воспаления.

При естественном течении воспаления количество палочкоядерных нейтрофилов в периферической крови колеблется волнообразно. Наблюдается тенденция к повышению их на 1-е сутки, а также максимально достоверное увеличение их на 2-е сутки, что совпадает с развитием лейкоцитоза, обусловленного активацией кроветворения.

Достоверное повышение количества палочкоядерных нейтрофилов сохраняется на 5-е сутки и совпадает с аналогичным изменением общего количества лейкоцитов и, по-видимому, связано с развитием гиперплазии костного мозга. На 7-е – 21-е сутки сохраняется тенденция к повышению количества палочкоядерных нейтрофилов по сравнению с исходным состоянием, которая также соответствует колебаниям общего количества лейкоцитов и свидетельствует, с одной стороны, об активации лейкопоэза, с другой – об усилении выхода лейкоцитов в очаг, то есть о хронизации воспаления, которое продолжается до 28-х суток, когда наблюдается тенденция к снижению количества палочкоядерных нейтрофилов по сравнению с исходным состоянием.

Содержание палочкоядерных нейтрофилов на фоне применения глюкозаминилмурамилдипептида на 2-е сутки в крови достоверно превышало их содержание в контроле в 2,33 раза ($p < 0,05$). В остальные сроки оно существенно не отличалось от такового в контроле и в предыдущие сроки исследования. Динамика количества палочкоядерных нейтрофилов в крови совпадает с динамикой содержания сегментоядерных нейтрофилов и общего количества лейкоцитов. По сравнению с естественным течением воспаления количество палочкоядерных нейтрофилов достоверно меньше на 2-е и 5-е сутки соответственно в 2,7 раза ($p < 0,05$) и в 2,0 раза ($p < 0,05$). Это совпадает с тенденциями в отличиях сегментоядерных нейтрофилов и также свидетельствует о том, что достоверное уменьшение содержания палочкоядерных нейтрофилов может быть связано со снижением их эмиграции в очаг и соответственно менее выраженным гемопоэзом в связи со снижением хронизации воспаления.

При естественном течении воспаления наблюдается тенденция к снижению содержания эозинофилов на 6-й час и 28-е сутки. Достоверное повышение их количества по сравнению с контролем наблюдается на 5-е и 10-е сутки, а в остальные сроки наблюдается тенденция к повышению их количества. Количество эозинофилов сходно с изменениями общего количества лейкоцитов и отражает преобладание эмиграции клеток над поступлением их из костного мозга в периферическую кровь сначала в связи с острым периодом воспаления, а затем с хронизацией процесса. При воспалении на фоне применения глюкозаминилмурамилдипептида содержание эозинофилов достоверно повышается на 2-е, 3-и и 7-е сутки, когда обнаруживается выраженная эозинофилия, связанная с усилением гемопоэза в период вовлечения гранулоцитов, что соответствует периоду хронизации воспаления. По сравнению с естественным течением воспаления содержание эозинофилов достоверно понижается на 1-е сутки в 2,4 раза ($p < 0,001$) и достоверно повышается на 28-е сутки в 2,5 раза ($p < 0,05$). Это соответствует данным в этот период по общему количеству лейкоцитов, содержанию сегментоядерных и палочкоядерных нейтрофилов и также свидетельствует о том, что применение глюкозаминилмурамилдипептида уменьшает хронизацию воспаления.

При естественном течении воспаления наблюдается достоверное увеличение количества моноцитов крови по сравнению с контролем на 1-е, 2-е, 5-е, 7-е, 10-е сутки. Наблюдается тенденция к увеличению их количества на 6-й час, 3-и, 14-е и 21-е сутки и тенденция к снижению количества моноцитов на 28-е сутки в сравнении с исходным состоянием. Увеличение содержания моноцитов на 1-е – 2-е сутки связывают с усилением лейкопоэза, а также пиком моноцитарной инфильтрации очага в остром периоде воспаления; на 5-е – 10-е сутки в связи с гиперплазией костного мозга. Последующее изменение числа моноцитов в крови отражает хронизацию воспаления – повторную эмиграцию моноцитов и активацию лейкопоэза [13, 14].

При воспалении на фоне применения глюкозаминилмурамилдипептида содержание моноцитов в динамике воспаления достоверно отличается от контроля на 2-е, 5-е, 7-е и 14-е сутки. Это, по-видимому, связано с повторным усиленным выходом моноцитов в очаг в связи с хронизацией воспаления. По сравнению с естественным течением воспаления наблюдается достоверное снижение количества моноцитов на 1-е и 5-е сутки (соответственно в 2,17 раза, $p < 0,001$, и 1,8 раза, $p < 0,05$), что созвучно с динамикой общего количества лейкоцитов и содержанием гранулоцитов и свидетельствует о том, что применение глюкозаминилмурамилдипептида уменьшает хронизацию воспаления.

При естественном течении воспаления количество лимфоцитов в крови достоверно снижается по сравнению с контролем на 6-й час и достоверно повышается на 2-е, 5-е и 14-е сутки.

Как известно, изменение количества лимфоцитов в периферической крови в начальные сроки воспаления связано с их хомингом – миграцией в костный мозг и лимфоидные органы для инициации усиленного гемопоэза и иммунных реакций, колебания количества лимфоцитов в более поздние сроки свидетельствуют о повторном усилении эмиграции в очаг и активации лимфопоэза в связи с хронизацией воспаления [11].

При воспалении на фоне применения глюкозаминилмурамилдипептида количество лимфоцитов в крови на 6-й час воспаления имеет тенденцию к снижению по сравнению с контролем в 1,31 раза, а на 3-е и 5-е сутки – к повышению. На 1-е и 2-е сутки наблюдается достоверное повышение количества лимфо-

цитов по сравнению с контролем соответственно в 2,21 раза ($p < 0,001$) и 2,19 раза ($p < 0,01$). Кроме этого, содержание лимфоцитов на 1-е сутки достоверно превышает предыдущий срок, то есть 6 часов, в 2,9 раза, $p < 0,001$.

К 7-м суткам количество лимфоцитов приближается к исходному. К 10-м суткам наблюдается тенденция к повышению их количества в 1,43 раза. На 14-е сутки содержание лимфоцитов достоверно превышает их содержание в контроле в 1,86 раза ($p < 0,01$), на 21-е сутки достоверно снижается по сравнению с 14-ми сутками в 1,52 раза ($p < 0,01$), но все же продолжает наблюдаться тенденция к повышению как на 21-е, так и на 28-е сутки соответственно в 1,22 и 1,19 раза.

По сравнению с естественным течением воспаления количество лимфоцитов достоверно меньше при применении глюкозаминилмурамилдипептида на 5-е сутки в 1,81 раза ($p < 0,05$), в остальные сроки исследования

статистически не отличается от естественного течения воспаления. Эти данные по течению и направленности воспаления аналогичны таковым для моноцитов и свидетельствуют о том, что применение глюкозаминилмурамилдипептида снижает интенсивность хронизации воспаления.

Таким образом, как следует из показателей лейкоцитарной реакции периферической крови в динамике карагиненового вторично хронического воспаления, применение глюкозаминилмурамилдипептида приводит к снижению хронизации процесса, что свидетельствует о возможности использования препарата для профилактики хронического воспаления.

Перспектива дальнейших исследований состоит в усовершенствовании противовоспалительной, патогенетической терапии хронических воспалительных заболеваний.

Литература

1. Клименко Н.А. Роль воспаления в патологии / Н.А. Клименко // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2010. – № 2. – С. 20–21.
2. Клименко Н.А. Гематологические механизмы хронизации воспаления / Н.А. Клименко, А.Н. Шевченко. – Харьков: ХНМУ, 2010. – 88 с.
3. Одинец Ю.В. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор в комплексной терапии воспалительных заболеваний инфекционного генеза, не сопровождающихся нейтропенией / Ю.В. Одинец, Н.А. Клименко, А.Н. Шевченко // Врачебная практика. – 2004. – № 5. – С. 32–42.
4. Шевченко А.Н. Лейкоцитарная реакция периферической крови при вторично хроническом воспалении на фоне применения натрия нуклеината / А.Н. Шевченко, Л.И. Коваленко // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2012. – Т. 7, № 3. – С. 117–123.
5. Андропова Т.М. Теоретические проблемы использования иммуномодулятора ликопида в клинической практике / Т.М. Андропова, М.М. Чумакова // Терап. архив. – 2002. – № 1. – С. 70–72.
6. Обоснование модели хронизирующегося (вторично хронического) воспаления / Н.А. Клименко, С.В. Татарко, А.Н. Шевченко, Г.И. Губина-Вакулик // Експериментальна і клінічна медицина. – 2007. – № 2. – С. 24–28.
7. Клименко Н.А. Роль лейкоцитов в реакции тучных клеток очага воспаления / Н.А. Клименко // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1993. – № 9. – С. 249–253.
8. Машковский М.Д. Лекарственные средства : пособие для врачей / М.Д. Машковский. – 16-е изд., перераб., испр. и доп. – М. : Новая волна, 2010. – 1216 с.
9. Рыболовлев Ю.Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константе биологической активности / Ю.Р. Рыболовлев, Р.С. Рыболовлев // Журнал Акад. мед. наук СССР. – 1979. – № 6. – С. 1513–1516.
10. Лабораторные методы исследования в клинике : справочник / под ред. В.В. Меньшикова. – М. : Медицина, 1987. – 364 с.
11. Дыгай А.М. Воспаление и гемопоэз / А.М. Дыгай, Н.А. Клименко. – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1992. – 275 с.
12. Дыгай А.М. Теория регуляции кроветворения / А.М. Дыгай // Бюл. Сибирской медицины. – 2004. – № 4. – С. 5–17.
13. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation / M.A. Ingersoll, A.M. Platt, S. Potteaux, G.J. Randolph // Trends Immunol. – 2011. – Vol. 32, № 10. – P. 470–477.

14. Chronic inflammation: molecular pathophysiology, nutritional and therapeutic Interventions / eds. S. Roy, D. Bagchi, S.P. Raychaudhuri. – Boca Raton : CRC Press, 2012. – 472 p.

О.М. Шевченко, В.О. Бібіченко

**ВИРАЖЕНІСТЬ ЛЕЙКОЦИТАРНОЇ РЕАКЦІЇ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЗА УМОВИ
КАРАГІНЕНОВОГО ВТОРИННО ХРОНІЧНОГО ЗАПАЛЕННЯ НА ТЛІ ЗАСТОСУВАННЯ
ГЛЮКОЗАМІНІЛМУРАМІЛДИПЕПТИДУ**

В експерименті на щурах показано, що при запаленні на тлі застосування глюкозамініл-мураміддипептиду в порівнянні з природним перебігом процесу в початкові терміни кількість лейкоцитів у периферичній крові більша, у віддалені терміни – менша. Посилення лейкоцитарної реакції у початкові терміни запалення призводить до більш ефективної елімінації карагінену і зниження хронізації запалення, з чим пов'язана знижена потреба в лейкоцитах у період хронізації. Отже, використання глюкозамінілмураміддипептиду призводить до зниження хронізації запалення.

Ключові слова: карагіненове вторинно хронічне запалення, периферична кров, лейкоцити, глюкозамінілмураміддипептид.

A.N. Shevchenko, V.A. Bibichenko

**EXPRESSIVENESS LEUKOCYTE REACTION OF PERIPHERAL BLOOD AT KARAGENIN'S
SECONDARY CHRONIC INFLAMMATION DURING TREATMENT
WITH GLYUKOZAMINILMURAMILDIPETID**

In an experiment on rats showed that in inflammation during treatment with glyukozaminil-muramildipeptid compared with the natural course of the process in the initial terms number of leukocytes in peripheral blood is more and in the remote terms their number is less. Increased leukocyte reaction in the initial periods of inflammation leads to more effective elimination of karaginen and to a reduction of chronic inflammation. Reducing demand in leukocytes during the chronicity are associated with it. Consequently, the use of glyukozaminilmuramildipeptid reduces chronic inflammation.

Key words: karaginen secondary chronic inflammation, peripheral blood, leukocytes, glyukozaminil-muramildipeptid.

Поступила 23.03.16