

УДК 619:616 – 07:616.15:611
© 2013

*Слюсар Г. В., здобувач**

Полтавська державна аграрна академія

ДИНАМІКА ІМУНОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ КРОВІ СОБАК ЗА РІЗНИХ МЕТОДІВ ЛІКУВАННЯ РАН

Рецензент – кандидат ветеринарних наук О. О. Міланко

Наведено динаміку імунологічних показників за різних методів лікування ран у собак. Доведено, що місцеве застосування препаратів гіалуронової кислоти та трифузолу у комплексному лікуванні гнійних ран у собак стимулює загоєння шляхом прискорення репаративних процесів. Встановлено більш швидке відновлення показників специфічної та неспецифічної резистентності організму в фазу регенерації та проліферації ранового процесу: підвищення вмісту Т і В-лімфоцитів, імунорегуляторного індексу, фагоцитарного числа, а також НСТ-тесту.

Ключові слова: *собаки, рани, лімфоцити, імуноглобуліни, фагоцитоз.*

Постановка проблеми. Процес загоєння ран є одним з основних механізмів захисту організму від травм. Проте існують обставини, коли цей фізіологічний процес порушується – й репарація ран відбувається повільно. Тому пошуки нових методів раціональної патогенетичної терапії залишаються важливою проблемою сучасної хірургії.

Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми. Швидкість загоєння рани залежить від характеру травми, кількості нежиттєздатних тканин та вірулентності мікрофлори, що її контамінувала. Показники імунобіологічної реактивності організму – фактори, що визначають розвиток гнійно-запальних процесів. Однак під час лікування гнійних хірургічних захворювань із використанням антибіотиків спостерігають зниження показників імунітету, особливо у тварин із гіпоергічним типом реактивності. Тому застосування імуностимулювальної терапії є патогенетично необхідним компонентом комплексного лікування ран [1].

Встановлено, що похідні триазолу мають імуностимулювальну, гепатопротекторну, протизапальну та антиоксидантну активність. Препарати стимулюють еритро- і лейкопоетичні функції.

Крім цього вони мають бактерицидні й фунгіцидні властивості. Використання хірургічної обробки та внутрішньом'язових ін'єкцій трифузолу дає змогу скоротити терміни загоєння ран [2].

Мета – встановити імунологічні показники крові за різних методів лікування ран у собак.

Завдання: застосувати препарати гіалуронової кислоти та трифузолу у комплексному лікуванні гнійних ран; визначити вміст Т і В-лімфоцитів, імунорегуляторного індексу, фагоцитарного числа, а також НСТ-тесту.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проводили на безпородних собаках із шкірно-м'язовими ранами площею 50–60 см². Перші п'ять днів щоденно проводили ревізію ран і місцеву механічну обробку, застосували курс антибактеріальної терапії (15 % амоксициклін, INVESA). Далі тварин поділили на дві групи. Для лікування тварин першої групи використали мазь метилурацил із мірамістином та додаванням у неї 1 % гіалуронової кислоти і 1 % ВПК-108 (трифузол). Мазь використовували у вигляді поверхневих аплікацій раз на добу. Друга група слугувала контролем (застосували мазь метилурацил із мірамістином). У тварин обох піддослідних груп відбирали кров до початку експерименту, а також на 6-у, 12-у і 24-у добу після поранення.

Мазь метилурацил із мірамістином (ЗАТ фармацевтична фірма «Дарниця», Україна) містить метилурацил, який стимулює метаболічні процеси, та мірамістин – катіонний антисептик. Трифузол – похідне 1,2,4-тріазолу, має антиоксидантні, гепатопротекторні, протизапальні властивості. Рекомендується для лікування локалізованих запально-гнійних процесів [2].

Гіалуронова кислота – несольфатований глікозаміноглікан, що входить до складу сполучної, епітеліальної й нервової тканин. Для досліджень була використана гіалуронова кислота бактеріального походження (*Streptococcus equi*) фірми «Fluka» (Швейцарія).

* Науковий керівник – доктор ветеринарних наук, професор В. Й. Іздепський

Кількість Т- і В-лімфоцитів визначали методом фенотипування у тестах розеткоутворення з частками, вкритими моноклональними антитілами. Для оцінки функціонального стану В-системи імунітету у сироватці крові визначали вміст трьох основних класів імуноглобулінів – М, G, А – методом радіальної імунодифузії в агарі (за Г. Манчині). Фагоцитарну активність визначали за методиками А. С. Прилуцкого. Окиснюваль-но-відновлювальну здатність нейтрофільних гранулоцитів оцінювали в НСТ-тесті [3].

Результати досліджень. Клінічним обстеженням встановлено, що за застосування в II і III фазах ранового процесу мазі метилурацил із мірмістином із додаванням гіалуронової кислоти і ВПК-108 відмічали прискорення росту грануляційної тканини та крайової епітелізації. У тварин першої групи загоєння ран реєстрували на 23–25-у, другої – на 27–29-у добу.

Імунний статус оцінювали за характеристикою функціональної активності Т- і В-лімфоцитів з урахуванням їх абсолютного та відносного вмісту у крові. На дванадцятую добу досліджень у тварин першої групи вірогідно зросла кількість лімфоцитів і становила $4344,5 \pm 243,7$ кл/мкл, що вище, ніж на шосту добу експерименту, в 1,8 разу й вище від вихідного показника на 64,3 % ($p < 0,01$). Рівень Т-лімфоцитів становив $41,83 \pm 1,49$ %, що вище, ніж попередній показник, на 10,1 %; до того ж їх абсолютна кількість зросла до $1816,5 \pm 116,04$ кл/мкл, що вдвічі більше порівняно з шостою добою досліджень.

У тварин другої контрольної групи на дванадцятую добу досліджень також реєстрували зростання кількості лімфоцитів, проте менш виражене, ніж у першій. Даний показник становив $2684,33 \pm 346,79$ кл/мкл, що вище від попереднього значення на 16,8 %, однак нижче, ніж у тварин першої групи, в 1,6 разу ($p < 0,05$). Відсотковий вміст Т-лімфоцитів становив $33,00 \pm 1,15$ %, що менше від аналогічного показника у першій піддослідній групі на 21,1 % ($p < 0,05$). Вміст регуляторних субпопуляцій становив CD4+ – $29,83 \pm 0,91$ % та CD8+ лімфоцитів – $19,83 \pm 0,91$ %. Імунорегуляторний індекс – $1,51 \pm 0,08$, що нижче, ніж у собак першої групи, на 20,9 % ($p < 0,01$).

Абсолютний і відносний лімфоцитоз розвивається після передачі інформації про антиген лімфоцитам від антигенпрезентуючих клітин.

Перехід імунної відповіді в лімфоцитарну фазу клінічно виявляється зменшенням клінічних проявів запалення – загальних (гіпертермія, інтоксикація) і місцевих (набряк, почервоніння, біль). Лімфоцитарні реакції стимулюють факто-

ри природної резистентності, внаслідок чого імунна відповідь стає більш ефективною. У період розвитку запальних реакцій імунорегуляторний індекс сягає високих показників за рахунок значного відсоткового вмісту Т-хелперів (CD4+ Т-клітин). У період регенерації ІРІ зменшується у зв'язку з наростанням рівня CD8+ Т-клітин (кілерів).

На 24-у добу після початку досліджень у тварин обох груп реєстрували тенденцію до зниження вмісту всіх субпопуляцій лімфоцитів. Абсолютна кількість лімфоцитів у собак першої групи становила $2807,0 \pm 142,51$ кл/мкл, що нижче від попереднього значення в 1,5 разу, проте вище, ніж у тварин другої групи, на 13,9 % ($p < 0,05$). У цей період зазнав зниження відсотковий вміст Т-лімфоцитів – $30,33 \pm 1,36$ %, що нижче на 27,5 %, ніж показник на дванадцятую добу досліджень і на 25,7 % менше вихідного значення. Їх абсолютна кількість становила $849,83 \pm 50,36$ кл/мкл, що на 18,3 % вище, ніж у тварин другої групи. Зниження CD3+ лімфоцитів відбувалося переважно за рахунок Т-хелперів – даний показник становив 26,67 %, що менше попереднього значення на 35,2 %. Рівень CD8+ лімфоцитів також зменшився до $18,17 \pm 0,48$ % порівняно з вихідним показником – 27,67 % ($p < 0,001$). Імунорегуляторний індекс становив $1,47 \pm 0,05$.

У тварин другої контрольної групи на 24-у добу досліджень також реєстрували знижений рівень лімфоцитів – $2464,67 \pm 56,01$ кл/мкл, що вірогідно нижче, ніж у собак першої групи, на 13,9 % ($p < 0,05$). Відсотковий вміст Т-лімфоцитів становив $29,17 \pm 2,44$ %, їх абсолютна кількість – $718,5 \pm 62,97$ кл/мкл. Відбулися також зміни серед субпопуляцій CD3+ лімфоцитів: вміст Т-хелперів зменшився до $23,17 \pm 1,14$ %, що менше вихідного показника на 52,4 % і вірогідно нижче, ніж у тварин першої піддослідної групи на 13,1 %. На противагу, відсоток CD8+ лімфоцитів збільшився й становив $20,5 \pm 0,8$ %, що вище, ніж аналогічний показник у собак першої групи на 12,8 % ($p < 0,05$). За рахунок цього зменшився імунорегуляторний індекс – $1,14 \pm 0,06$ і був вірогідно нижчим, ніж у тварин першої групи. Така закономірність свідчить про ймовірність хронічного перебігу інфекційного процесу через неповну ерадикацію збудника.

Для кількісної оцінки ефекторної ланки клітинного імунітету визначали вміст великих гранулярних лімфоцитів (ВГЛ) – популяції клітин, до складу якої входять природні кілери. У тварин обох груп вірогідне зростання вмісту при-

родних кілерів реєстрували на дванадцять добу експерименту. Відповідні показники становили у тварин першої групи $17,83 \pm 0,95$ кл/мкл, у другої – $16,17 \pm 0,87$, що вище ніж перед експериментом у 1,9 та 1,8 рази ($p < 0,01$ і $p < 0,05$ відповідно). Подібні зміни виявляли також на 24-у добу спостережень.

Ефекторною ланкою гуморальної імунної відповіді є синтез антитіл і фагоцитоз, за рахунок якого знешкоджуються сформовані імунні комплекси. Гуморальну ланку імунітету характеризують рівні CD22+-клітин (В-лімфоцитів), а також рівні імуноглобулінів різних класів (IgM, IgG, IgE, сироваткового і секреторного IgA).

На дванадцять добу експерименту у тварин першої групи вміст В-лімфоцитів становив $26,33 \pm 0,61$ %, що вище вихідного значення на 8,9 %. Проте їх абсолютна кількість ($1148,5 \pm 84,12$ кл/мкл) порівняно з вихідним значенням зросла в 1,8 разу ($p < 0,01$). Відсотковий вміст В-лімфоцитів у тварин другої групи становив $24,5 \pm 0,99$, що нижче вихідного на 4,6 %. Абсолютне число CD22+ лімфоцитів – $653,5 \pm 79,71$ кл/мкл, що менше, ніж у тварин першої групи, в 1,8 разу ($p < 0,05$).

Імуноглобуліни М – це антитіла гострого періоду імунної відповіді, що синтезуються плазматичними клітинами при першому контакті з певним патогеном. Вони мають здатність активувати комплемент, що забезпечує реалізацію комплементзалежної цитотоксичності. Високі концентрації специфічних IgM у собак обох груп реєстрували на дванадцять добу досліджень. У тварин першої групи – $1,2 \pm 0,02$ г/л, що вище, ніж перед дослідженнями, на 36,4 % ($p < 0,001$); у собак другої – $1,14 \pm 0,02$ г/л, вище від вихідного показника на 12,9 % ($p < 0,05$), проте нижче, ніж у тварин першої групи, на 5 %. Наступними дослідженнями встановлено зниження вмісту IgM у тварин обох груп.

Імуноглобуліни G – це антитіла пізньої фази імунної відповіді, вони є більш специфічними, ніж IgM; мають лише два центри зв'язування антигену й меншу молекулярну масу, тому володіють більшою проникністю до периферичних тканин. Максимальні показники на 24-у добу – $1,12 \pm 0,01$ г/л у першій групі та $1,1 \pm 0,02$ г/л – у другій, що вище ніж на початку досліду на 27,3 % ($p < 0,001$) та 8,9 % ($p < 0,05$) відповідно. Високі рівні специфічних IgG реєстрували в період регенеративних процесів та одужання, поскільки саме цей клас антитіл продукують клітини імунної пам'яті.

Вміст імуноглобулінів А у процесі досліду за-

знав неістотних коливань у тварин обох груп: у собак першої групи дані показники коливалися від 0,9 до 0,95 г/л, у другої – $0,92 - 1,01$ г/л.

Систему природженої резистентності характеризують величина фагоцитарного числа (ФЧ) і фагоцитарного показника (ФП), а також значення НСТ-тесту. До того ж ФЧ і ФП дають можливість оцінити поглинальну активність фагоцитів, а НСТ-тест – інтенсивність «кисневого вибуху», що характеризує метаболічні процеси фагоцитуючих клітин.

Збільшення фагоцитарного показника у собак обох груп реєстрували на дванадцять добу експерименту: у тварин першої групи до $46,83 \pm 0,91$ %, що вище, ніж перед експериментом, на 13,7 % ($p < 0,05$). У собак другої групи цей показник становив $43,33 \pm 1,05$ %, що вище вихідного значення на 4,4 %, проте менше на 7,5 %, ніж у тварин першої групи ($p < 0,05$). На 24-у добу експерименту фагоцитарний показник у собак, яким застосовували ГК і ВПК-108, залишався на високому рівні ($46,5 \pm 0,85$ %), що перевищувало показник другої піддослідної групи ($41,83 \pm 1,05$ %) на 11,2 % ($p < 0,01$).

Аналогічні тенденції реєстрували в процесі аналізу динаміки фагоцитарного числа у піддослідних собак. У тварин першої групи цей показник зріс на дванадцять добу – $5,5 \pm 0,22$ од., що вище ніж перед дослідженням на 24 % ($p < 0,05$). Максимуму він досяг на 24-ту добу ($6,17 \pm 0,31$ од.). У тварин другої групи фагоцитарне число упродовж досліду було вірогідно нижчим, аніж у собак першої піддослідної групи (на 12-у добу – $6,67 \pm 0,21$ од., 24-у – $4,67 \pm 0,33$ од.).

Тест із нітросинім тетразолієм (НСТ-тест) відображає рівень активації кисневозалежних механізмів бактерицидності фагоцитуючих клітин. Вірогідне зростання показників НСТ-тесту у тварин реєстрували на дванадцять добу ранового процесу. У тварин першої групи він становив $1,74 \pm 0,11$, що вдвічі вище ніж перед дослідженнями ($p < 0,001$). У собак другої групи даний показник також у цей період зріс до $1,46 \pm 0,07$, що вище ніж вихідне значення у 1,8 разу ($p < 0,05$). Подальшими спостереженнями встановлено зниження показників НСТ-тесту у тварин обох груп.

Підвищені показники НСТ-тесту на початкових етапах ранового процесу в обох групах вказують на зміну функціонально-метаболічної активності лейкоцитів. Зниження рівнів активності НСТ-тесту реєстрували в період регенерації та загоєння ран, тобто на 24-у добу досліджень.

Отже, імунологічні показники обох піддослід-

них груп на шосту добу досліджень істотно не відрізнялись. У всіх тварин реєстрували вірогідне зниження CD4+ лімфоцитів, як наслідок – ІРІ також знизився. На 12-у добу досліджень реєстрували суттєві відмінності між показниками контрольної та дослідної груп. У тварин першої групи, яким використали для лікування ВПК-108 та ГК, абсолютний вміст лімфоцитів (зокрема Т- і В-лімфоцитів) був вірогідно вищим ніж у тварин другої групи. Серед регуляторних субпопуляцій значно збільшилася частка CD4+ Т-клітин, за рахунок чого зріс показник імунорегуляторного індексу. На відміну, у тварин другої групи ІРІ був у цей період вірогідно нижчим.

У період загоєння (24-а доба досліджень) реєстрували різницю вмісту CD8+ лімфоцитів: у тварин другої (контрольної) групи даний показник був вірогідно вищим, аніж у собак дослідної; як наслідок – імунорегуляторний індекс був нижчим. Більш низькі значення ІРІ у контрольних

тварин порівняно з дослідними можуть свідчити про хронічний перебіг запальних процесів.

У тварин першої групи, яких лікували з використанням ВПК-108 і ГК, реєстрували вірогідно вищі показники фагоцитарного числа й фагоцитарного показника на 12–24-у добу досліджень.

Висновки:

1. Місцеве застосування препаратів гіалуронової кислоти та трифузолу у комплексному лікуванні гнійних ран у собак стимулює загоєння ран шляхом прискорення репаративних процесів.

2. Використання трифузолу і гіалуронової кислоти сприяє відновленню показників специфічної та неспецифічної резистентності організму в фазу регенерації й проліферації (12-а доба): підвищенню вмісту Т-клітин (1816,5±116,04 кл/мкл), В-лімфоцитів (1148,5±84,12 кл/мкл), фагоцитарного показника (46,83±0,91 %), фагоцитарного числа (5,5±0,22 од.), а також НСТ-тесту (1,74±0,11).

БІБЛІОГРАФІЯ

1. *Гайдюк М. Б.* Обґрунтування доцільності застосування ербісолу за гнійних запальних процесів у собак / М. Б. Гайдюк, Н. М. Хомин // Науковий вісник ветеринарної медицини: Зб. наук. праць. – Біла Церква, 2010. – Вип. 4 (76). – С. 35–37.
2. *Киричко Б. П.* Патогенетичне обґрунтування лікування тварин із запальною хірургічною па-

тологією препаратами з антиоксидантною дією / Б. П. Киричко : автореф. дис. ... докт. вет. наук : 16.00.05 – ветеринарна хірургія / Б. П. Киричко. – К., 2010. – 36 с.

3. *Лаповець Л. Є.* Посібник із лабораторної імунології / Л. Є. Лаповець, Б. Д. Луцик. – Львів, 2002. – 173 с.