

ОЦЕНКА ИММУННОЙ РЕАКЦИИ У СОБАК ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ ТЕРМООКСИДНЫХ ОСТЕОФИКСАТОРОВ

А.В. КРАСНИКОВ, В.В. АННИКОВ, Е.С. КРАСНОВА,
Л.В. АННИКОВА, В.В. ДЕРЕВЯНЧЕНКО

КРАСНИКОВ Александр Владимирович – доцент кафедры паразитологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», кандидат ветеринарных наук

АННИКОВ Вячеслав Васильевич - профессор кафедры паразитологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», доктор ветеринарных наук

КРАСНОВА Елена Сергеевна – ветеринарный врач ООО «Первая ветеринарная клиника», кандидат ветеринарных наук

АННИКОВА Людмила Викторовна - доцент кафедры терапии, акушерства и фармакологии ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», кандидат ветеринарных наук

ДЕРЕВЯНЧЕНКО Владимир Владимирович - аспирант кафедры паразитологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ»

Адрес: Театральная площадь, 1, г. Саратов, РФ, 410012. Тел. (+7)-927-224-70-63, (+7)917-024-64-05, (+7)906-316-57-93, . (+7)917-314-10-90, (+7)904-771-91-31. E-mail: krasnikov.77@mail.ru; vetdoc-annikov@mail.ru; elena-Krasnova@rambler.ru; alaw67@inbox.ru; vl-derevyanchenko@yandex.ru

Ключевые слова: кролики, перелом, остеофиксатор, кость, клеточный иммунитет, гуморальный иммунитет, лантан.

В статье изложены результаты исследований клинико-гематологических и иммунологических изменений в организме травматологически больных животных при установке им остеофиксаторов из стали 12Х18Н9Т, изготовленных методом термоокислительной обработки и внесением в состав покрытия лантана.
Библ. 6.

В 25% и более случаев от общего количества незаразной патологии у мелких непродуктивных животных регистрируются травмы опорно-двигательного аппарата. При этом отмечаются различные виды фрактур конечностей [1].

Согласно современным исследованиям, развитие травматической болезни происходит в результате нарушения целостности кости. Вне зависимости от степени и ограниченности повреждения тканей имеют решающее значение функциональные изменения в органах и системах, в том числе и в органах иммунной системы, поскольку известно, что при травме происходит комплекс типичных изменений в иммунной системе, которые являются общими для всего организма [3]. Также известно, что хирургическое вмешательство может вызвать иммунодепрессивное состояние [5]. В связи с этим является актуальным изучение степени иммунодепрессии у пациентов получивших травмы и выбор оптимального метода хирургической помощи, где одним из важных компонентов является выбор способа установки (чрескостный, интрамедуллярный, накостный) имплантируемого материала. Известно также, что лантан способствует профилактике тромбозов, нередко возникающей при переломах [2].

Задачи исследования.

1. Проанализировать клинико-гематологические показатели животных с инициированным переломом.

2. Определить функциональную активность органов иммунной системы при имплантации остеофиксаторов, модифицированных лантаном.

3. Дать оценку состоянию клеточного и гуморального иммунитета травматологически больных животных при имплантации им остеофиксаторов, модифицированных лантаном.

Материалы и методы исследований Научные исследования проводились при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, соглашение № 14.В37.21.0571. Объектом исследования явились 12 кроликов породы «Черный великан» в возрасте шесть месяцев с живой массой 4,5 кг. Опытные животные были разделены по принципу аналогов на две группы по 6 голов в каждой. Также объектом исследования явились остеофиксаторы из медицинской биотолерантной стали 12Х18Н9Т (ГОСТ 5632-72) обогащенные лантаном методом

термооксидирования и без введения в состав покрытия лантана. У кроликов флекссионный перелом бедренной кости в области средней трети диафиза проводился под нейролептанальгезией. Животным первой (контрольной) группы установили остеофиксаторы из медицинской биотолерантной стали 12X18H9T (ГОСТ 5632-72), а второй (опытной) группе такие же остеофиксаторы, но обогащенные лантаном с помощью воздушно-термического оксидирования при 400°C.

Послеоперационная терапия включала в себя стандартные, принятые в ветеринарной хирургии процедуры.

Материалами для исследования послужили пробы крови.

Клинический осмотр проводили по общепринятой в ветеринарии методике [4].

Гематологические и иммунологические показатели определяли до оперативного вмешательства, на 3-е, 14-е и 30-е сутки эксперимента.

Все полученные результаты исследований были обработаны с помощью программы Statistica 6.

Для исследования иммунологического состояния и оценки эффективности применения остеофиксаторов с термооксидным покрытием, обогащенным лантаном у экспериментальных животных определяли уровень Т- и В- лимфоцитов в периферической крови [6].

Забор крови у животных проводили до операции, на 3-е, 14-и, 30-е сутки. Вначале стерильным шприцем с 0,1 мл гепарина отбирали кровь из ушной вены в количестве 6 мл. Затем осторожно, спуская по стенке, переливали в стерильные пробирки. Плазму получали, отстаивая гепаринизированную кровь в течение четырех часов. При 1500 оборотах в минуту, трехкратно центрифугируя, получали количество лейкоцитов, используя 14,3%-й раствор верографина, и среду 199. Параллельно отмывали физиологическим раствором эритроциты барана и мыши, затем центрифугировали их в течение 15 мин при 1500 об./мин. Затем готовили 0,5% взвесь на среде 199. После этого проводили соединение исследуемых лимфоцитов с эритроцитами – маркерами при температуре 37 °С. Инкубировали в течение 5 мин и отстаивали 1 час при комнатной температуре. После чего готовили мазки, которые окрашивали по Романовскому-Гимза после фиксации. Лимфоцит принимали за розеткообразующую клетку (РОК), если он присоединил не менее трех эритроцитов. Подсчитывали относительное количество розеткообразующих единиц под микроскопом Биомед-5 под общим увеличением 1000. Абсолютное количество Т- и В- лимфоцитов в крови получали расчетным путем.

Результаты исследований. В обеих экспериментальных группах в клиническом состоянии животных в первые дни после операции существенных отличий отмечено не было. У животных через сутки после оперативного вмешательства мы отмечали угнетение общего состояния, снижение двигательной активности, отсутствие аппетита, повышение температуры тела до 39,9 – 40,1 °С. При пальпации травмированных конечностей регистрировали незначительный отек окружающих мягких тканей, гиперемиию кожи, а также реакцию отдергивания конечности, что позволяет нам судить о наличии болевой реакции. Также при движении у кроликов регистрировалась хромота опорного типа.

К 30 суткам эксперимента при клиническом исследовании экспериментальных животных отмечалось удовлетворительное состояние у всех пациентов. В частности, общая температура тела, пульс дыхание были в пределах физиологической нормы. Опорная функция поврежденной конечности к концу эксперимента полностью восстановилась. Однако из под остеофиксаторов, введенных в метафизарные зоны, у кроликов контрольной группы отмечалось незначительное выделение серозного экссудата.

Изменения в составе крови после установки остеофиксаторов с термооксидным покрытием, модифицированного лантаном, выявляли проведением общего анализа крови. Полученные результаты до начала эксперимента соответствовали показателям крови животных у экспериментальных групп физиологическим нормам.

На третьи сутки после операции уровень эритроцитов незначительно снизился и составил в первой группе $3,1 \pm 0,2 \times 10^{12}/л$, а во второй $3,8 \pm 0,2 \times 10^{12}/л$. Отмеченные колебания были незначительными и свидетельствовали о малой травматичности выбранного вида остеосинтеза и, как следствие, незначительном влиянии костной травмы на эритропоэз. Более того, к 30 суткам количество их достигло исходного уровня, как в первой, так и во второй группах.

Количество лейкоцитов в начале эксперимента находилось в пределах физиологической нормы. К 3 суткам после остеосинтеза наблюдался существенный лейкоцитоз, который составил $7,9 \pm 1,4 \times 10^9/л$ в первой и $7,6 \pm 1,4 \times 10^9/л$ - во второй, группах. Такая тенденция сохранялась и к 14 суткам ($8,5 \pm 0,1 \times 10^9/л$ в первой и $8,9 \pm 0,9 \times 10^9/л$ - во второй, группах). Это состояние связано с проявлением защитно-компенсаторной реакции организма животных,

направленной на купирование воспалительного процесса, инициированного продуктами распада крови, образовавшимися вследствие перелома. К 30 суткам в крови у кроликов первой группы отмечалось снижение количества лейкоцитов с $6,3 \pm 0,1 \times 10^{12}/л$ до $5,8 \pm 0,8 \times 10^9/л$. У кроликов второй группы количество лейкоцитов увеличилось к этому сроку, составив $7,3 \pm 0,1 \times 10^9/л$ к $6,3 \pm 0,2 \times 10^9/л$ до операции.

Уровень гематокрита у животных в обеих группах на 3 сутки незначительно повысился, составив $48,2 \pm 1,5\%$ в первой и $43,7 \pm 1,7\%$ во второй. На 14 и 30 сутки уровень гематокрита был в пределах физиологической нормы.

Положительная динамика уровня гемоглобина была также отмечена у животных обеих групп к окончанию эксперимента. В частности, в первой группе на 30 сутки уровень гемоглобина увеличился, составив $108,2 \pm 1,4 г/л$, на 3-е сутки после операции он был $103,2 \pm 0,4 г/л$. Во второй группе его уровень также увеличился, но незначительно, составив при этом $109,3 \pm 1,5 г/л$, а на 3-е сутки после операции он составлял $103,7 \pm 0,4 г/л$. Такие данные свидетельствуют об активации насыщения эритроцитов кислородом, поскольку гипоксия тканей является неизбежной в результате костной травмы.

Уровень палочкоядерных нейтрофилов у животных обеих групп к 3 суткам был увеличен по сравнению к начальным данным незначительно, а на 30 сутки вернулся к исходным показателям. Количественный показатель сегментоядерных нейтрофилов у животных обеих групп снижался, но к 30 суткам данные соответствовали исходным.

Уровни лимфоцитов, моноцитов и базофилов на период эксперимента оставался в пределах нормы.

Для изучения иммунологических процессов, протекающих в организме животных в результате развития костной травмы, определяли количество Т- и В- лимфоцитов и их субпопуляций.

В ходе эксперимента нами было установлено, что до оперативного вмешательства относительное количество Т- лимфоцитов в первой группе составило $67,8\%$, во второй $68,7\%$, что в абсолютном выражении составило $1,5$ и $0,7 \times 10^9/л$ соответственно. На долю В-лимфоцитов пришлось $4,0\%$ в первой и $4,3\%$ во второй группах. Соответственно, абсолютное содержание составило $0,05 \times 10^9/л$ и $0,03 \times 10^9/л$.

На третьи сутки после остеосинтеза в крови относительное содержание Т- лимфоцитов составило $45,7\%$ в первой группе и $42,8\%$ во второй, В-клеток периферической крови - $2,4\%$ в обеих группах. В абсолютном выражении уровень Т-клеток составил $0,8 \times 10^9/л$ и $0,7 \times 10^9/л$ соответственно, а В-клеток $0,04 \times 10^9/л$ в обеих группах.

Дальнейшее снижение количества иммунных клеток в периферической крови отмечалось к 14 суткам, как в относительном, так и в абсолютном содержании. Содержание Т-лимфоцитов в первой группе составило $41,1\%$, во второй группе $36,7\%$ в относительных величинах, а в абсолютном выражении составило $0,7 \times 10^9/л$ и $0,6 \times 10^9/л$ соответственно. Что касается относительного количества В-лимфоцитов, то оно было в пределах $1,9\%$ в первой и $2,0\%$ во второй группах и составило в абсолютном количестве $0,03 \times 10^9/л$ и $0,03 \times 10^9/л$ соответственно.

Таким образом, у экспериментальных животных обеих групп на протяжении тридцати суток после остеосинтеза отмечалось постепенное снижение Т- и В- лимфоцитов как в абсолютных, так и в относительных величинах по отношению к исходным величинам, что свидетельствует о незначительном угнетении клеточного звена иммунитета. Отсутствие значительной разницы в группах свидетельствует об отсутствии токсического влияния лантана на иммунопоэз.

Заключение. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что экспериментальные остеофиксаторы не оказывают угнетающего действия как на эритро-, так и на лейкопоэз, поскольку динамика таких показателей как общее количество эритроцитов, гемоглобина, гематокрита, общее количество лейкоцитов совпадало у кроликов обеих групп и соответствовала стадиям развития травматической болезни. В лейкограмме кроликов обеих групп на протяжении всего срока существенных сдвигов выявлено не было.

Остеофиксаторы с термооксидным покрытием, содержащим в своем составе лантан, не вызывают депрессии механизмов гуморального и клеточного звеньев иммунитета (Т-клетки – $42,8 \pm 2,9\%$ через 3 суток после операции, через 30 суток – $42,8 \pm 4,3\%$, В-клетки – $2,4 \pm 0,3\%$ через 3 суток после операции, на 30-е сутки – $3,3 \pm 0,3\%$).

ЛИТЕРАТУРА. 1. Анников В.В. Анатомо-хирургические аспекты оптимизации репаративного остеогенеза в условиях внешней фиксации аппаратами стержневого типа. Дисс. ...д-ра вет. наук.- М. 2006. –365 с. 2. Васильченко Е.Е. Тромбоэмболия легочной артерии у пациентов с имплантированными электрокардиостимуляторами: дисс. ...канд. мед. наук -

Томск, 2005-223 с. 3. Ватников Ю.А. Травматическая болезнь – нозологическая единица в ветеринарной хирургии [текст] / Ю.А. Ватников// Материалы XI Московского Международного ветеринарного конгресса. – М.,2003. – 142-143 с. 4. Смирнов А.М., Конопелько П.Я., Пушкарев Р.П. и др. Клиническая диагностика внутренних незаразных болезней животных. М.: Агропромиздат, 1988. - 512 с. 5. Хаитов Р. М., Пинегин Б. В. Изменение иммунитета при хирургических вмешательствах. Ж. Анналы хирургической гепатологии. Том 3 №2-М. 1998. стр. 100-110. 6. Фролов В. М., Векслер Х. М. Методы оценки чувствительности иммунокомпетентных клеток к иммуноактивным препаратам и их значение для клинической практики. - Рига: Знатне, 1991.- с. 102-106.

UDC: 619: 617-7: 546.56: 549.282

PARAMETERS OF HUMORAL AND CELLULAR IMMUNITY IN IMPLANT TERMOOXIDIC OSTEOCLAMPS ENRICHED WITH LANTHANUM

KRASNIKOV, Aleksandr V. – Lecturer of Federal State Educational Institution of Higher Education «Saratov State Agrarian University», Candidate of Veterinary Sciences

Address: Str. Big Mountain, 359-213, Saratov, Russian Federation, 410600

Tel. 8-927-224-70-63, krasnikov.77@mail.ru

ANNIKOV, Vjacheslav V. – Professor of Federal State Educational Institution of Higher Education «Saratov State Agrarian University», Doctor of Veterinary Science

Address: app. 238, 6, 2-nd passage Blinova, Saratov, Russian Federation, 410006

Tel. 8-917-024-64-05, vetdoc-annikov@mail.ru

KRASNOVA, Elena S. –veterinary doctor of the LLC «the First veterinary clinic», Candidate of Veterinary Sciences

Address: app. 2, 3, Kirova street, Tsarevshchinavillage, Baltaysky area, Saratov region, Russian Federation, 412636

Tel. 8-906-316-57-93, elena-Krasnova@rambler.ru

ANNIKOVA, Lyudmila V. - Lecturer of Federal State Educational Institution of Higher Education «Saratov State Agrarian University», Candidate of Veterinary Sciences

Address: app.67, 32, Navashina street, Saratov, Russian Federation, 410010

Tel.8-917-314-10-90, alaw67@inbox.ru

DEREVYANCHENKO, Vladimir V. - Post graduate student of Federal State Educational Institution of Higher Education «Saratov State Agrarian University»

Address: 6, Tekhnicheskaya street, Volgograd, Russian Federation, 400087

Tel.8-904-771-91-31, vl-derevyanchenko@yandex.ru

Keywords: rabbits, fracture osteofiksator, bone, cellular immunity, humoral immunity, lanthanum.

Summary. This article contains information about clinical and hematological and immunological changes in trauma patients when implanted animals they osteofiksatorov steel 12X18H9T passing termooksidirovanie and enriched lanthanum. The authors found that these osteofiksatory not have immunosuppressive effects on animals.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES. 1.

1. Annikov V. V. Anatomical and surgical aspects of optimization of repairing osteogenesis in the conditions of external fixation devices rod type. Dis. ... Dr.Vet.Sciences.- М 2006.–365 p.2. Vasilchenko E.E. Tromboemboliya of a pulmonary artery at patients with the implanted electropacemakers: Dis. Kand.Med.Sciences.-Tomsk, 2005-223 p.3. Vatnikov Yu.A. Traumatic disease - nosological unit in veterinary surgery [text] / YU. A. Vatnikov// Materials of the XI Moscow International veterinarian Congress. - М.,2003. - 142-143 p.4. Smirnov A.M., Konopelko P. Ya., Pushkarev R.P., etc. Clinical diagnostics of internal noncontagious diseases of animals. М: Агропромиздат, 1988. - 512 p.5. Haitov R. M., Pinegin B. V. Change of immunity for surgical interventions. G. Annals of surgical Hepatology. Vol. 3 №2- М. 1998.- P.100-110.6. Frolov V. M., Vexler H. M. Methods of estimation of the sensitivity of immunocompetent cells to immunoactive preparations and their implications for clinical practice. - Riga: Znatne, 1991.- P. 102-106.