

УДК: 619:616 – 07:616.15:611.018.54

Іздепський В.Й., докт. вет. наук., професор; Слюсар Г.В., здобувач;

Передера Р.В., канд. вет. наук, доцент; Лавріненко І.В. ©

Полтавська державна аграрна академія

## ДИНАМІКА МОРФОЛОГІЧНИХ ТА ІМУНОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ КРОВІ ЦУЦЕНЯТ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ РАНОВОМУ ПРОЦЕСІ

У статті наведено динаміку морфологічних та імунологічних показників крові при експериментальному рановому процесі у собак. В ранній пост травматичний період реєстрували зміни морфологічного складу крові, що характеризуються зниженням кількості еритроцитів, вмісту гемоглобіну, лейкоцитозом та нейтрофілією з регенеративним зрушенням ядра. В крові травмованих тварин виявлено зниження відсотків Т-лімфоцитів за рахунок регуляторних субпопуляцій.

**Ключові слова:** цуценята, рана, кров, лейкоформула, лімфоцитограма, Т-лімфоцити.

**Вступ.** Процес загоєння ран представляє собою ланцюг взаємопов'язаних біологічних процесів, які потребують достатніх репаративних властивостей організму та виявляються не лише місцево, але й охоплюють весь організм. Перебіг ранового процесу значною мірою залежить від стану імунної реактивності організму [1]. Тому об'єктивний висновок про стан захисних сил організму при рановому процесі повинен базуватися на клініко-лабораторних дослідженнях, серед яких важлива роль належить імунологічним тестам [2, 3].

**Мета:** вивчити динаміку морфологічних та імунологічних показників крові цуценят при загоєнні експериментальних ран.

**Матеріали і методи.** Роботу виконували в умовах клініки ветеринарної медицини кафедри хірургії та акушерства факультету ветеринарної медицини Полтавської державної аграрної академії. Експериментальні дослідження проводили на цуценятах шестимісячного віку (n=6). Перед дослідженнями тварин вакцинували, дегельмінтизували та обробляли від ектопаразитів. Попередньо готували операційне поле: вистригали шерстний покрив і обробляли місце розрізу 70% розчином спирту. Експериментальні рани площею 400 мм<sup>2</sup> наносили скальпелем в ділянці стегна.

Кров відбирали з латеральної підшкірної вени передньої кінцівки перед експериментом та на третю, п'яту, 17-ту і 32-гу добу після поранення. Її стабілізували гепарином (20 од. на 1 мл крові). У крові досліджували: вміст гемоглобіну, кількість еритроцитів та лейкоцитів, швидкість осідання еритроцитів, виводили лейкограму. Всі вищенаведені дослідження виконували за загальноприйнятими методами [4].

Кількість Т- і В-лімфоцитів визначали методом фенотипування у тестах розеткоутворення з частками, вкритими моноклональними антитілами. Для цього стабілізовану кров відстоювали в тонких пробірках. Плазму відділяли та центрифугували при 500 об./хв. упродовж трьох хвилин. Потім до осаду лейкоцитів додавали фізіологічний розчин хлориду натрію на фосфатному буфері і знову центрифугували. В круглі лунки імунологічних планшет вносили 0,025 мл CD-діагностикуму антитіл і додавали рівний об'єм лімфосуспензії, після чого суміш інкубували 25 хв. при 37 °С. Потім ставили на годину в холодильник за температури 4 °С. Після цього надосадову рідину зливали, а до осаду додавали 0,025 мл глютарового альдегіду й робили мазки на знежирених предметних стеклах, які висушували, фіксували спиртом і фарбували за Романовським. Підраховували відсоток розеткоутворюючих лімфоцитів, що зв'язали не менше трьох еритроцитів із CD-антитілами [5].

Отриманий цифровий матеріал обробляли статистично, при цьому визначали середню арифметичну (М) та статистичну помилку середньої арифметичної (m).

Експериментальні дослідження проводили з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), норм біомедичної етики та відповідних законів України [6-7].

**Результати досліджень.** Клінічним обстеженням дослідних тварин упродовж перших трьох діб дослідження реєстрували прояви загальної реакції організму на травму, що характеризувалися пригніченням, втратою рухомості та зниженням апетиту. Температура тіла була підвищеною, частота дихання і пульсу знаходилася на рівні верхніх меж фізіологічних коливань. Рановий процес у тварин дослідної групи перебігав по вторинному натягу, в неускладненій формі та характеризувався стадійністю.

На першу-третю добу розвитку ранового процесу реєстрували період судинних змін, що виявлявся гіперемією біляранових тканин, краї ран були набряклі, болючі. На п'яту добу досліджень ознаки запалення зберігалися, окрім цього реєстрували початок формування грануляційної тканини. На дні рани виявляли незначні крупнозернисті регенерати. В подальшому (6–14 доба) вони зливалися, утворюючи цільну грануляційну тканину, паралельно спостерігали повільну епітелізацію ранової поверхні. Повне загоєння ран реєстрували на 23–25 добу досліджень.

Із метою розкриття патогенезу ранового процесу визначали окремі показники клініко-імунологічного статусу. Гематологічними дослідженнями встановлено, що на початку дослідження всі показники крові тварин піддослідної групи знаходилися в межах фізіологічної норми (табл.1).

Аналізуючи зміни морфологічного складу крові упродовж перших п'яти діб після нанесення експериментальних ран встановили, що у крові тварин піддослідної групи дещо зменшувалася кількість еритроцитів. Так, на третю добу досліджень даний показник становив  $3,82 \pm 0,20$  Т/л, на п'яту –  $3,55 \pm 0,24$  Т/л що на 2,1 % і 9,0 % менше ніж до експерименту. Вірогідне

зниження вмісту гемоглобіну в піддослідних собак реєстрували на третю добу досліджень –  $108,83 \pm 2,88$  г/л ( $p < 0,01$ ), при цьому він був нижчим на 14,31 % ніж перед дослідом. Упродовж подальших досліджень встановлено поступове зростання кількості еритроцитів та вмісту гемоглобіну, на 32-гу добу ці показники становили  $4,62 \pm 0,21$  Т/л ( $p < 0,05$ ) та  $135,17 \pm 3,63$  г/л.

Таблиця 1.

**Динаміка фізико-хімічних та морфологічних показників крові цуценят, при експериментальних ранах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )**

Показники		Перед дослідженням	Період досліджень				
			3 доба	5 доба	17 доба	32 доба	
Еритроцити, Т/л		$3,9 \pm 0,14$	$3,82 \pm 0,20$	$3,55 \pm 0,24$	$4,03 \pm 0,12$	$4,62 \pm 0,21$ *	
Гемоглобін, г/л		$127,00 \pm 2,32$	$108,83 \pm 2,88$ **	$121,50 \pm 3,23$	$127,33 \pm 3,48$	$135,17 \pm 3,63$	
ШОЕ, мм/год		$2,67 \pm 0,33$	$6,50 \pm 0,43$ ***	$9,00 \pm 0,73$ ***	$3,50 \pm 0,67$	$3,83 \pm 0,40$	
Лейкоцити, Г/л		$5,52 \pm 0,29$	$8,95 \pm 0,14$ ***	$9,48 \pm 0,82$ **	$8,43 \pm 0,14$	$6,78 \pm 0,09$	
Лейкоформула	еозинофіли, %	$2,00 \pm 0,37$	$1,33 \pm 0,21$	$2,33 \pm 0,33$	$1,67 \pm 0,21$	$2,67 \pm 0,21$	
	базофіли, %	$0,83 \pm 0,31$	$0,67 \pm 0,33$	$0,67 \pm 0,33$	$1,17 \pm 0,31$	$0,33 \pm 0,21$	
	нейтрофіли, %	паличкоядерні, %	$3,50 \pm 0,43$	$5,33 \pm 0,42$ *	$8,17 \pm 0,31$ ***	$4,17 \pm 0,31$	$2,50 \pm 0,43$
		сегментоядерні, %	$61,17 \pm 1,11$	$68,83 \pm 1,14$	$69,83 \pm 1,64$	$63,83 \pm 1,08$	$64,67 \pm 1,12$
	лімфоцити, %	$29,00 \pm 1,65$	$22,50 \pm 1,12$ *	$16,50 \pm 0,67$ ***	$25,33 \pm 0,76$	$26,67 \pm 0,95$	
	моноцити, %	$3,50 \pm 0,85$	$1,33 \pm 0,21$	$2,50 \pm 0,56$	$3,83 \pm 0,31$	$3,17 \pm 0,48$	

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  порівняно з показниками до експерименту

Дегенеративно-запальний період ранового процесу супроводжувався зростанням швидкості осідання еритроцитів. Максимальною вона була на п'яту добу досліджень –  $9,00 \pm 0,73$  мм/год, що в 3,4 раза більше ніж показник, що мав місце перед дослідженням ( $p < 0,001$ ). Збільшення швидкості осідання еритроцитів пов'язано із підвищенням вмісту глобулінів, які сприяють агрегації еритроцитів. На 17-ту та 32-гу добу швидкість осідання еритроцитів знаходилася в межах фізіологічних коливань.

Процес загоєння експериментальних ран супроводжувався збільшенням кількості лейкоцитів до  $8,95 \pm 0,14$  Г/л на третю добу досліджень ( $p < 0,001$ ). Максимальний підйом даного показника реєстрували на п'яту добу –  $9,48 \pm 0,82$  Г/л ( $p < 0,01$ ). На 17-ту добу досліджень кількість лейкоцитів становила  $8,43 \pm 0,14$  Г/л, що на 52,72 % вище ніж перед дослідженням, проте на 11,1 % менше ніж попереднє значення. Лейкоцити мігрують у вогнище запалення, де здійснюють свої специфічні функції.

При дослідженні крові найбільш суттєві зміни у лейкограмі встановили на третю та п'яту добу після поранення. На третю добу відсоток паличкоядерних нейтрофілів зріс до  $5,33 \pm 0,42$  % порівняно з  $3,50 \pm 0,43$  % до експерименту ( $p < 0,05$ ). Їх максимальний відсотковий вміст –  $8,17 \pm 0,31$  % реєстрували на п'яту добу досліджень ( $p < 0,001$ ). Нейтрофіли відносяться до фагоцитуючих клітин, які завдяки своїм властивостям забезпечують протиінфекційний захист організму. Крім того, вони виділяють речовини, що стимулюють процеси регенерації у пошкоджених тканинах [8].

Упродовж всього періоду досліджень реєстрували зниження відсотка лімфоцитів. На третю добу після поранення вміст лімфоцитів становив  $22,50 \pm 1,12$  %, що на 22,41 % менше ніж вихідне значення. На п'яту добу цей показник досяг мінімального значення та становив  $16,50 \pm 0,67$  %, що на 43,1 % менше показника, що мав місце перед експериментом. Зниження відсотка лімфоцитів вказує на зниження імунної реактивності.

Отже, у процесі загоєння експериментальних ран у собак в першу фазу ранового процесу реєстрували зміни морфологічного складу крові. Вони характеризувалися зниженням кількості еритроцитів, вмісту гемоглобіну, лейкоцитозом та нейтрофілією з регенеративним зрушенням ядра.

Імунний статус оцінювали за характеристикою функціональної активності Т- і В-лімфоцитів, з урахуванням їх абсолютної та відносної кількості у крові (табл. 2). В ранній пост травматичний період ранового процесу реєстрували зміни показників лімфоцитограми та імунорегуляторного індексу. На третю добу після нанесення експериментальних ран відсотки Т- і В- лімфоцитів суттєво не відрізнялися від вихідних значень, однак зросла їх абсолютна кількість в крові. Рівень CD3+ лімфоцитів становив  $1037,79 \pm 121,62$  кл/мкл, CD22+лімфоцитів –  $5,37 \pm 61,60$  кл/мкл.

На п'яту добу після початку досліджень спостерігали незначне зниження відсоткового вмісту Т-лімфоцитів до  $35,50 \pm 1,34$  %, що на 27,55 % менше, ніж до експерименту ( $p < 0,001$ ). При цьому в Т-лімфоцитарній ланці відбулися зміни серед класів лімфоцитів. Відсоток Т-хелперів зменшився до  $38,83 \pm 0,79$  % (на 24,12 %,  $p < 0,001$ ), Т-супресорів – становив  $17,83 \pm 1,14$  %, що на 30,08 % менше, ніж перед дослідженням ( $p < 0,01$ ). За рахунок цього дещо зріс імунорегуляторний індекс, який становив  $2,23 \pm 0,18$ , що на 7,73 % більше вихідного значення.

На 17-ту добу досліджень рівень Т-лімфоцитів знизився до  $33,67 \pm 1,76$  %, що на 5,15 % менше порівняно з попереднім значенням, проте їх абсолютна кількість зросла на 40,43 %. При цьому відсоток CD8+лімфоцитів становив  $19,67 \pm 0,76$  %, що вище на 10,32% ніж попереднє значення, проте нижче показника, що мав місце перед дослідженням на 22,86 %. Відсотковий вміст CD4+лімфоцитів становив  $34,67 \pm 1,23$  %, що на 10,71 % менше попереднього значення, та на 32,25 % менше показника до експерименту. Імунорегуляторний індекс в цей період становив  $1,77 \pm 0,07$ , що на 14,49 % менше ніж перед дослідженням ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 2.

**Динаміка імунологічних показників крові цуценят, при  
експериментальних ранах (M±m, n =6)**

Показники		Перед дослідженням	Період досліджень			
			3 доба	5 доба	17 доба	32 доба
Т-лімфоцити (CD3+)	%	49,00±0,52	47,83±1,30	35,50±1,34 ***	33,67±1,76 ***	43,17±1,70 *
	кл/ мкл	780,55± 50,29	1037,79± 121,62	523,03± 23,93	734,47± 36,05	785,58± 57,87
Т-хелпери (CD4+)	%	51,17±1,60	49,00±1,13	38,83±0,79 ***	34,67±1,23	41,17±1,45 **
Т-супресори/кілери (CD8+)	%	25,5±0,85	26,17±0,95	17,83±1,14 **	19,67±0,76 **	24,50±1,77
ІРІ, CD4+/CD8+		2,07±0,09	1,89±0,09	2,23±0,18	1,77±0,07 *	1,74±0,17
В-лімфоцити (CD22+)	%	29,33±0,49	28,33±1,05	31,83±1,97	24,17±0,95 **	26,17±1,28 *
	кл/ мкл	467,19± 30,01	605,37± 61,60	469,31± 30,81	516,77± 29,13	472,39± 25,20
Природні кілери (CD16+)	кл/ мкл	10,5±0,76	8,17±0,60	8,33±1,12	10,17±0,75	9,5±0,76

\* p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\* p<0,001 порівняно з тваринами контрольної групи

На 32-гу добу досліджень про відновлення рівноваги свідчило зростання абсолютного та відсоткового вмісту лімфоцитів. Відсоток Т-лімфоцитів становив 43,17±1,70 %, В-лімфоцитів – 26,17±1,28 %

Таким чином, зміни лімфоцитограми при загоєнні експериментальних ран у собак характеризувалися зменшенням вмісту Т-лімфоцитів та регуляторних субпопуляцій. Зниження рівнів лімфоцитів в крові пов'язано із міграційними властивостями даних клітин та їх локальною інфільтрацією, що відображає процеси місцевого запалення. При хірургічних захворюваннях зміни імунобіологічної реактивності виявляли R.M.Bolton (1979), С.М.Renk (1982), К.А. Петраков (1991).

#### **Висновки.**

При загоєнні експериментальних ран у собак реєструються зміни морфологічного складу крові в першу фазу ранового процесу. Вони характеризуються лейкоцитозом, нейтрофілією з регенеративним зрушенням ядра. Реакція Т-системи імунітету характеризувалася зниженням загальної кількості Т-лімфоцитів та регуляторних субпопуляцій.

#### **Література**

1. Шехтер А.Б. Репаративная регенерация и дисрегенерация (роль межклеточных взаимодействий) / А.Б. Шехтер // Современные проблемы регенерации.– Йошкар-Ола, 1987.– С. 48-63.

2. Лефковитс И. Методы исследований в иммунологии / И. Лефковитс, Б. Перес. – М.: Мир, 1981. – 485 с.
3. Уорд А.М. Иммунохимия в клинической лабораторной практике / А.М. Уорд, Д.Т. Уитчер. – М.: Медицина, 1981. – 238 с.
4. Кондрахин И.П. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии: Справочное издание/ И.П. Кондрахин, Н.В. Курилов, А.Г. Малахов и др. – М.: Агропромиздат, 1985. – 287 с.
5. Sakai M. Phenotypic analysis of hepatic T lymphocytes in a dog with chronic hepatitis / M. Sakai, I. Otani, K Ishigaki, et.al. // J.Vet.Med Sci. – 2006. – V.68(11). – P. 1219-21.
6. Европейская конвенция по защите домашних животных // Сучасна ветеринарна медицина. – 2003. – С. 149–154.
7. Закон України про захист тварин від жорстокого поводження від 21.02. 2006 р. – № 3447 – IV / Відомості Верховної Ради України (ВВР). – 2006. – № 27. – С. 230.
8. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. – Новосибирск: Наука, 1989. – 344 с.
9. Bolton P.M. The effects of major and minor trauma on lymphocyte kinetics in mice / P.M. Bolton, S.M. Kirov, K.J. Donald // Austral. J.Exp.Biol. and Med.Sci. – 1979. – V. 57. (5). – P. 479–492.
10. Renk C.M., Long C.L., Blakemore W.S. Comparison between in vitro lymphocyte activity and metabolic changes in trauma patients / C.M. Renk, C.L. Long, W.S. Blakemore // J. Trauma. – 1982. – V.22(2). – P. 134–140.
11. Петраков К.А. Клинико-иммунологический статус и иммунокоррекция при хирургической травме у КРС: Метод. рекомендации / К.А. Петраков, А.М. Наметов, В.Н. Денисенко. – М., 1991. – 28 с.

#### Summary

**V.Izdepskiy, G.Slyusar, R.Peredera, I.Lavrinenko.**

#### **THE DYNAMICS OF MORPHOLOGIC AND IMMUNOLOGICAL INDECES OF PUPPIES BLOOD AT EXPERIMENTAL PROCESS IN WOUND IS SHOWN.**

*The dynamics of morphologic and immunological indeces of puppies blood at experimental process in wound is shown in the article. In early post-traumatic period changes in morphologic blood content were and they were characterized by the reduce of the number of erythrocytes, hemoglobin content, leucocytosis and neutrophilia with regenerative shift of nucleus. The reduce of percent of T-lymphocytes because of regulating subpopulations in the blood of traumatic animals is found.*

*Стаття надійшла до редакції 14.04.2010*