

УДК 619:616-006.34:615:636.7

СИНЯГОВСЬКА К.А., САРБАШ Д.В., ЗАЙКА П.О., кандидати вет. наук

Харківська державна зооветеринарна академія

max_milos@mail.ru

ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА ЗАСТОСУВАННЯ ІМУНОСТИМУЛОВАЛЬНОЇ ТЕРАПІЇ ЗА ОСТЕОСАРКОМИ У СОБАК

У статті представлено порівняльні методи протипухлинної терапії із застосуванням імуностимулювальних препаратів у лікуванні собак, хворих на остеосаркому довгих трубчастих кісток з метою подовження терміну життя хворих тварин. Дослідженням кількісних показників великих гранульованих лейкоцитів та ацидофільних гранул в їх цитоплазмі визначено ефективність включення до терапевтичного плану протипухлинної терапії імуностимулювальних препаратів за остеосаркоми у собак. Результати оцінені за критерієм тривалості життя собак у кожній терапевтичній групі.

Ключові слова: остеосаркома, великий гранульований лімфоцит, гранули, імуностимуляція.

Постановка проблеми. Розвиток пухлин відбувається на фоні постійного контролю системи протипухлинного захисту. До першої лінії протипухлинного захисту організму відносять неспецифічну імунну відповідь, зумовлену значною мірою ПК-активністю [1–3]. В організмі людини і тварин функціонує популяція лімфоцитоподібних клітин, що володіють природною цитотоксичністю щодо клітин-“мішеней”. Вони отримали назву природних кілерів (ПК) та складають до 15 % лімфоцитів крові. У тварин основна маса ПК утворюється в печінці ріт-клітинами. Одна із функцій ПК – розпізнавання та знищення клітин деяких пухлин [1, 4, 5]. Морфологічно ПК ідентифікуються як великі гранульовані лімфоцити (ВГЛ). За дослідження мазків крові ВГЛ виглядають як крупні широкоцитоплазменні лімфоцити. В їх цитоплазмі міститься декілька гранул, що забарвлюються азуром у вишнево-фіолетовий колір [5].

На сьогодні накопичена значна кількість експериментальних даних, які вказують, що пригнічення активності ПК сприяло метастазуванню [2, 6–8]. Вважається, що ПК-клітинам належить важлива роль у запобіганні гематогених, але нелімфогенних метастазів, оскільки велику кількість природних кілерів виявляють саме у периферійній крові, але не в лімфатичних вузлах [3].

Відомо, що імунодефіцитний стан організму за злоякісних пухлин характеризується здебільшого зниженням кількісних і функціональних показників клітинного імунітету ПК-клітин, а проведення оперативних втручань чи хіміотерапії призводить до значного пригнічення стану імунної системи й вимагає ефективної екзогенної корекції [3].

Мета дослідження – визначити ефективність включення до терапевтичного плану протипухлинної терапії імуностимулювальних препаратів за остеосаркомою кісток у собак.

Матеріал і методика дослідження. Для визначення показників норми кількості ВГЛ та гранул в їх цитоплазмі відібрано 15 проб крові у клінічно здорових тварин. Також матеріалом для досліджень слугували 39 собак з остеосаркомою довгих трубчастих кісток, які надходили до кафедри хірургії Харківської державної зооветеринарної академії.

Залежно від проведеного лікування, тварин було поділено на три групи. Першу групу склали 10 собак, яким для лікування проведено по два курси ад'ювантної і неoad'ювантної хіміотерапії та ампутація кінцівки; друга група – 20 тварин, які отримали по 6 курсів поліхіміотерапії у поєднанні з імуностимуляцією; тваринам третьої групи (9) проведено по два курси неoad'ювантної і ад'ювантної поліхіміотерапії, ампутацію кінцівки та імуностимуляцію.

Для здійснення імуностимуляції застосовували препарати Циклоферон або Інtron А, завдяки імуномодулювальній активності яких нормалізується імунний статус – за рахунок активації ПК-клітин [5, 9].

Собакам II та III дослідних груп імунокорегуючі препарати призначали, починаючи із 7–10 дня після завершення усіх курсів хіміотерапії. Циклоферон вводили внутрішньом'язово у вигляді 12,5 % розчину в дозі 0,08 мл на 1 кг маси тіла тварини один раз на добу на 1, 2, 4, 6, 8-й дні. Курс повторювали через 4–5 днів. Інtron А вводили підшкірно в дозі 3 млн МО (1,2 мл) протягом 21 дня 3 рази на тиждень згідно з інструкцією.

Контроль за ефективністю імуностимулювальної терапії здійснювали на 7–10-й день після проведення імуностимуляції за критерієм збільшення кількості ВГЛ та гранул у них. Вміст ВГЛ у периферійній крові від 5–10 % і вище, а також наявність не менше 5–7 гранул у кожному свідчили про високу ПК-активність і ефективність проведеного лікування.

Результати досліджень та їх обговорення. З метою об'єктивної оцінки стану організму собак, а також визначення впливу застосованих протипухлинних терапевтичних заходів на рівень захисних реакцій організму було проведено клінічне дослідження та аналіз морфологічного складу крові тварин всіх груп. Дослідження проводили під час первинного та повторного прийомів, а в II та III дослідних групах додатково після застосування імуностимуляторів.

Після застосування імуностимуляторів температури тіла, частота пульсу й дихання були в межах норми. У собак відновився апетит, тварини були активні й охоче вигулювалися.

Зміни лейкограми тварин після проведення імуностимуляції відображені в таблиці 1. За її даними як у II, так і III дослідних групах застосування імуностимуляторів частково нормалізувало співвідношення різних форм нейтрофілів. Так, вірогідно зменшилася кількість юних нейтрофілів – до $2,2 \pm 0,2$ та $2,5 \pm 0,3$ % у II та III дослідних групах відповідно, що перевищує норму, але на 1,6 та 2,0 % менше за показники первинного обстеження. Частка сегментоядерних нейтрофілів вірогідно збільшилася на 7,7 та 4,5 %, а моноцитів – зменшилася – на 1,7 та 1,3 %.

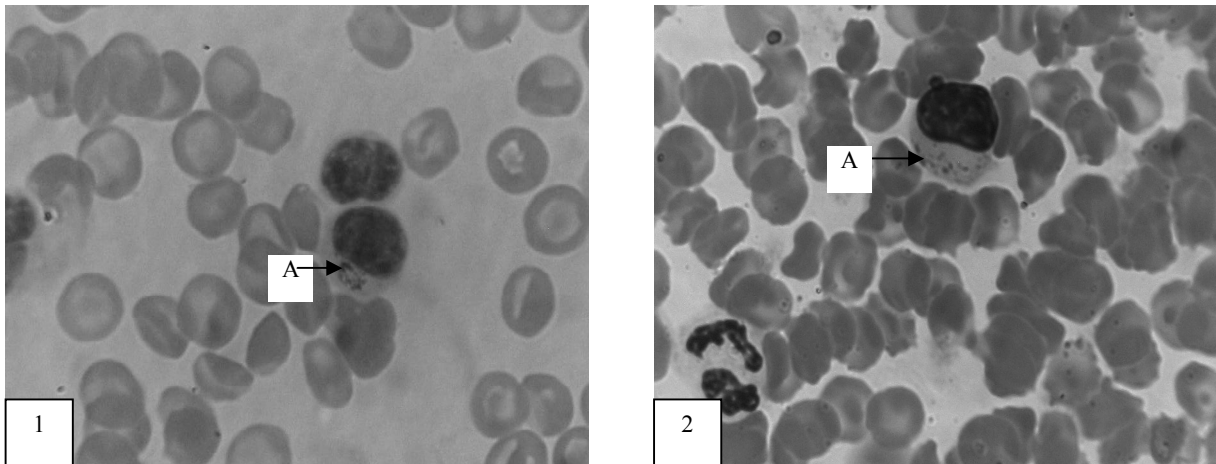
Таблиця 1 – Лейкограма тварин після імуностимуляції

№ з/п	Показник, у процентах	Біометричний показник	II дослідна група, n=20		III дослідна група, n=9	
			первинне обстеження	після імуности-муляції	первинне обстеження	після імуностимуляції
1	Базофіли	Lim	–	–	–	–
		M±m	–	–	–	–
2	Еозинофіли	Lim	3,5–7,0	2,7–7,5	1,7–8,0	3,7–6,0
		M±m	$5,0 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,3$	$5,5 \pm 0,6$	$5,0 \pm 0,3$
3	М	Lim	–	–	–	–
		M±m	–	–	–	–
4	Ю	Lim	0,8–6,2	0,7–4,0	2,7–6,7	1,2–3,7
		M±m	$3,8 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,2^{**}$	$4,5 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,3^{\bullet\bullet}$
5	П	Lim	4,8–9,2	5,2–7,7	6,2–10,5	6,0–8,7
		M±m	$7,0 \pm 0,3$	$6,5 \pm 0,2$	$8,0 \pm 0,5$	$7,5 \pm 0,3$
6	С	Lim	42,0–59,2	53,0–63,2	44,0–55,7	53,5–62,0
		M±m	$50,2 \pm 1,2$	$57,9 \pm 0,6^{***}$	$52,0 \pm 1,3$	$56,5 \pm 1,1^{\bullet}$
7	Лімфоцити	Lim	21,8–37,2	22,2–27,5	20,7–29,5	20,5–27,7
		M±m	$29,0 \pm 0,9$	$25,1 \pm 0,4^{***}$	$25,3 \pm 1,0$	$25,0 \pm 0,1$
8	Моноцити	Lim	2,5–7,5	0,7–4,7	3,2–6,2	2,2–4,7
		M±m	$5,0 \pm 0,4$	$3,3 \pm 0,2^{***}$	$4,8 \pm 0,4$	$3,5 \pm 0,3^{\bullet}$
9	ВГЛ	Lim	0–3,0	0,2–16,2	0–1,7	1,2–14,1
		M±m	$0,6 \pm 0,2$	$7,9 \pm 1,0^{***}$	$0,5 \pm 0,2$	$8,2 \pm 1,7^{\bullet\bullet\bullet}$

Примітки: * – різниця вірогідна у II дослідній групі тварин ($p < 0,05$); ** – ($p < 0,01$); *** – ($p < 0,001$); • – різниця вірогідна у III дослідній групі тварин ($p < 0,05$); •• – ($p < 0,01$); ••• – ($p < 0,001$).

Особливої уваги заслуговує кількісний показник ВГЛ, який у II дослідній групі, порівняно із первинним обстеженням, збільшився у 13,2, III – 16,4 рази і складав $7,9 \pm 1,0$ та $8,2 \pm 1,7$ % відповідно (від кількості лімфоцитів), а кількість гранул в їх цитоплазмі було від 4 до 15 (рисунки 1, 2).

Проте слід зазначити, що не всі собаки позитивно відреагували на проведення імунокорекції. У 9 тварин II та III груп після застосування циклоферону не виявили значного збільшення кількості ВГЛ, тому цим тваринам було призначено інший імунокорегуючий препарат Інtron А. Така специфічна відповідь з боку системи онкорезистентності організму доводить, що підбір імуностимулювальних препаратів має здійснюватися в кожному окремому випадку індивідуально, а підрахунок кількості ВГЛ та гранул в їх цитоплазмі дозволяє контролювати ефективність призначених препаратів.



Рисунки. 1, 2. Великий гранульований лімфоцит: А – 10–13 азурофільних гранул у цитоплазмі (фарбування за Май-Грюнвальд–Романовським; х 100)

Для оцінки стану організму собак всіх тварин досліджували під час повторного обстеження, яке проводили на 30–60-ту добу після виконання всіх лікувальних заходів.

Під час клінічного дослідження тварин їх загальний стан був задовільний. Температури тіла, частота пульсу та дихання перебували в межах норми. Собаки активні, апетит збережений, спрага – помірна. Регіонарні лімфатичні вузли – в межах норми.

Клінічні симптоми позитивної терапевтичної динаміки у тварин II дослідної групи, яких лікували комплексним консервативним методом наступні: припинення росту пухлини і навіть часткова регресія, зменшення болю, перифокального набряку і запальних процесів у прилеглих тканинах.

Результати проведених гематологічних досліджень за повторного прийому наведені в таблиці 2.

У 54 % тварин дослідних груп частка паличкоядерних нейтрофілів була вищою за верхню межу норми, лімфоцитів – у 20 % собак. Вірогідно збільшилася частка моноцитів у тварин II та III дослідних груп, яким проводили імуностимуляцію, порівняно з I дослідною групою, що свідчить про позитивний вплив імуностимуляторів у комплексі лікувальних заходів.

Звертає на себе увагу показник кількості ВГЛ, який без додаткової імуностимуляції складав $0,4 \pm 0,2$ %, що значно нижче за показник клінічно здорових тварин ($7,6 \pm 0,5$ %). У собак, яким проводили імуностимуляцію, ВГЛ в крові було $8,1 \pm 0,5$ та $9,3 \pm 0,9$ %. Порівняння змін у відсотковому відношенні кількості ВГЛ за повторного обстеження з показниками після імуностимуляції показує позитивну динаміку. Так, після проведення імуностимуляції виявлено 9 тварин, які не реагували на призначення імуностимулювальних препаратів, але після переведення тварин на препарат Інtron А частка ВГЛ у всіх тварин була у межах норми, а кількість гранул у їх цитоплазмі складала від 4 до 16.

Після завершення лікування, як результат прогресування пухлин, у собак через деякий час спостерігали розвиток метастазів. У зв'язку з цим деяких тварин було евтанізовано. Їх клінічні дослідження перед евтаназією виявили характерні ознаки прогресування пухлини. Собаки – пригнічені, адинамічні, неохоче вигулювалися. У них погіршувався апетит, вони періодично скиглили. Тварини худнули, у них з'являлася спрага.

Аналіз даних стосовно терміну життя тварин свідчить, що в собак I групи, де ампутацію кінцівки поєднували з хіміотерапією, його тривалість в середньому склала $158,1 \pm 4,0$ днів, собак II групи, де проводилося 6 курсів хіміотерапії у поєднанні з імуностимуляцією – $248 \pm 5,5$ днів, а собак III групи, де було проведено по 2 курси неoad'ювантної і ад'ювантної хіміотерапії, імуностимуляцію та ампутацію кінцівки – $376 \pm 5,2$ днів.

На підставі аналізу результатів проведених досліджень з визначення ефективності різних методів лікувальних заходів та включення у терапевтичний план імуностимуляторів зроблено наступні висновки.

Таблиця 2 – Лейкограма тварин у разі повторного обстеження за різних схем лікування

№ з/п	Показник, %	Біометричний показник	Клінічно здорові тварини, n=15	I дослідна група, n=10	II дослідна група, n=20	III дослідна група, n=9
-------	-------------	-----------------------	--------------------------------	------------------------	-------------------------	-------------------------

1	Базофіли	Lim	–	–	–	–
		M ± m	–	–	–	–
2	Еозинофіли	Lim	3,0 – 10,0	4,0 – 8,0	4,2 – 9,2	4,7 – 8,2
		M ± m	6,6 ± 0,6	6,3 ± 0,44	6,8 ± 0,3	6,5 ± 0,37
3	М	Lim	–	–	–	–
		M ± m	–	–	–	–
4	Ю	Lim	–	0,2 – 2,0	0 – 3,0	0,7 – 2,5
		M ± m	–	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,2 **	1,7 ± 0,2 ^Δ
5	П	Lim	1,0 – 5,0	3,7 – 7,0	2,7 – 7,2	3,2 – 7,0
		M ± m	3,2 ± 0,4	5,5 ± 0,35	5,2 ± 0,28	5,2 ± 0,4
6	С	Lim	43,0 – 72,0	51,7 – 62,7	41,7 – 62,0	50,2 – 58,2
		M ± m	59,0 ± 1,9	56,5 ± 1,1	53,3 ± 1,24	55,2 ± 0,1
7	Лімфоцити	Lim	18,0 – 34,0	24,7 – 34,2	23,7 – 40,0	24,0 – 31,7
		M ± m	25,5 ± 1,1	28,8 ± 0,96	31,0 ± 1,01 *	27,8 ± 0,8
8	Моноцити	Lim	3,0 – 8,0	1,0 – 2,5	1,5 – 4,7	2,2 – 5,0
		M ± m	5,7 ± 0,5	1,9 ± 0,2	2,8 ± 0,2 [■] *	3,6 ± 0,3 ^{ΔΔΔ}
9	ВГЛ	Lim	5,2 – 11,2	0 – 1,7	4,7 – 11,8	7,5 – 14,6
		M ± m	7,6 ± 0,5	0,4 ± 0,2	8,1 ± 0,5	9,3 ± 0,9 ^{ΔΔΔ}

Примітки: * – різниця вірогідна між II та III дослідними групами (p<0,05); ** – (p<0,01); *** – (p<0,001); ■ – різниця вірогідна між I та II дослідними групами (p<0,05); ■■ – (p<0,01); ■■■ – (p<0,001); Δ – різниця вірогідна між I та III дослідними групами (p<0,05); ΔΔ – (p<0,01); ΔΔΔ – (p<0,001).

Висновки. 1. Застосування імуностимулювальних препаратів дозволяє підвищити кількісний та функціональний показник клітинного імунітету, зокрема ПК-клітини, які ще на початку дослідження знаходяться у пригніченому стані та вимагають ефективної екзогенної корекції.

2. Підбір імуностимулювальних препаратів необхідно здійснювати індивідуально за критерієм кількості ВГЛ та гранул в їх цитоплазмі.

3. Проведення імуностимуляції собакам у II групі збільшує термін життя тварин у 1,5 раза, а поєднання імуностимуляції із застосуванням цитостатиків та операції (III група) – 2,4 рази порівняно з тваринами першої дослідної групи.

4. Для подовження терміну життя тварин у терапевтичний план мають бути включені наступні заходи: радикальне видалення пухлини, боротьба з латентними метастазами та активізація імунологічної резистентності, через збільшення кількості ВГЛ, які є кількісним і функціональним показником клітинного імунітету.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дейчман Г.И. Влияние естественной резистентности в реакции организма на возникновение, рост и метастазирование опухолей / Итоги науки и техники // Г.И. Дейчман. – ВИНТИ: Онкология, 1984. – Т. 13. – С. 46–97. Dejchman G.I. Rol' estestvennoj rezistentnosti v reakcii organizma na vzniknovenie, rost i metastazirovanie opuholej / Itoги науки i tehniki // G. I. Dejchman. – VINITI: Onkologija, 1984. – Т. 13. – С. 46–97.
2. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология / Г.Н. Дранник – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2003. – 604 с. Drannik G. N. Klinicheskaja immunologija i allergologija / G.N. Drannik – М.: ООО «Medicinskoe informacionnoe agentstvo». 2003. – 604 s.
3. Ройт А. Иммунология. / Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д.; пер. с англ. В.И. Кандрора, А.Н. Маца. – М.: Мир, 2000. – 592 с. Rojt A. Immunologija. / Rojt A., Brostoff Dzh., Mejl D.; per. s angl. V.I. Kandrora, A.N. Maza. – М.: Mir, 2000. – 592 s.
4. Зак К.П. БГЛ в норме и патологии / К. П. Зак. – М.: Медицина, 2001. – 163 с. Zak K. P. BGL v norme i patologii / K.P. Zak. – М.: Medicina. 2001. – 163 s.
5. Иммунология / [Берзофски Д.А., Берковер А.Дж., Браун Э.Дж. и др.]. Пер. с англ.; под ред. У. Пола. – [Т. 3]. – М.: Мир, 1987–1989. – 360 с. Immunologija / [Berzofski D.A., Berkover A.Dzh., Braun Je. Dzh. i dr.]. per. s angl. / pod red. U. Pola. – [t. 3.]. – М.: Mir, 1987–1989. – 360 s.
6. Yohihara H. Suppression of Natural Killer Cell Antivity by Surgical Stress in Cancer Patients and Underlying Mechanisms / H. Yohihara, N. Tanaka, K. Orita // Act. Med. – 1986. – Vol. 40, № 2. – April. – P. 113–119.
7. Murphy W. Natural Killer Cell and Marrow Transplantation / W. Murphy, C. W. Reynolds, P. Tiberghien // Journal of the National Cancer Institute. – 1993. – Vol. 85. – P. 1475–1482.
8. Whiteside T.L. Short Analytical Review. The Role of Natural Killer Cell in Human Disease / T.L. Whiteside, R.B. Herberman // Clinical immunology and immunopathology. – 1989. – Vol. 53, № 1. – October, P. 1–23.
9. Клінічна імунологія / [Бажора Ю.І., Запорожан В.М., Кресюн В.Й., Годзієва І.М.]. – Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2000. – 384 с. Klinichna imunologija / [Bazhora Ju.I., Zaporozhan V.M., Kresjun V.J., Godzieva I.M.]. – Odesa: Odes. derzh. med. un-t, 2000. – 384 s.

Сравнительная оценка применения иммуностимулирующей терапии при остеосаркоме у собак

Е.А. Сняговская, Д.В. Сарбаш, П.А. Занка

В статье представлены сравнительные методы противоопухолевой терапии с применением иммуностимулирующих препаратов при лечении собак с остеосаркомой длинных трубчатых костей с целью увеличения срока жизни больных животных. Путем определения количественных показателей больших гранулированных лейкоцитов и подсчета

ацидофильных гранул в их цитоплазме определяли эффективность включения в терапевтический план противоопухолевой терапии иммуностимулирующих препаратов при остеосаркоме у собак. Результаты оценены по критерию продолжительности жизни собак в каждой терапевтической группе.

Ключевые слова: остеосаркома, большой гранулярный лимфоцит, гранулы, иммуностимуляция.