

УДК 619:617-001.5:612.12:636.7

ПАТОГЕНЕТИЧНА РОЛЬ ОКСИДУ АЗОТУ В УМОВАХ ЗАПАЛЬНО-РЕПАРАТИВНОГО ПРОЦЕСУ ПРИ ПЕРЕЛОМАХ ТРУБЧАСТИХ КІСТОК У СОБАК ТА ЙОГО КОРЕКЦІЯ «ІМУНОМ-ДЕПО»

В. С. Шаганенко, М. В. Рубленко

Білоцерківський національний аграрний університет

Досліджено зміни рівня оксиду азоту та його динаміка за переломів трубчастих кісток у собак. Виявлено вплив рівня оксиду азоту на гемостазіологічні показники, зокрема за корекції рівня оксиду шляхом застосування препарату «ІМУНОМ-ДЕПО». Застосування останнього підвищує рівень оксиду азоту, активує вивільнення ендотелієм тканинного активатора плазміногену, що покращує мікроциркуляції тканин в ділянці травми та сприяє швидшому одужанню тварини.

Ключові слова: ПЕРЕЛОМ, ОКСИД АЗОТУ, ФІБРИНОЛІЗ, ГЕМОСТАЗ.

В останні роки у містах значно збільшилась кількість домашніх улюбленців, зокрема собак та кішок, збільшилась також різноманітність їх порід. Разом з тим підвищився рівень травматизму у тварин в умовах мегаполісів. За даними [11] він сягає 42–55 % усієї хірургічної патології. Серед усіх видів травм великий відсоток складають переломи кісток — до 59% [15], саме тому питання лікування переломів є актуальним.

Зрощення кісток або репаративний остеогенез — процес біологічний, багатостадійний і спрямований на ліквідацію пошкодження кістки. Переломи кісток хоча і носять локальний характер, але є істотною роллю пускових механізмів для цілого ряду морфологічних і біохімічних процесів в організмі. На травму кісток реагує не лише пошкоджений орган, а і весь організм в цілому. Відновлення кісток відбувається шляхом проліферації клітин камбіального шару окістя, ендоосту, строми кісткового мозку і мезенхімальних клітин адвентиції новоутворених судин. Репаративний остеогенез не можна розглядати як однотиповий за перебігом процес.

Поряд із хірургічним лікуванням для стимуляції репаративного остеогенезу широко використовують біополімерні матеріали — коллопан, кергап, мінерально-вітамінні добавки [10, 13].

У комплексному лікуванні переломів та їх наслідків використовуються різні фізичні фактори: магнітне поле, УВЧ, електростимуляція, рентгенотерапія, штучна локальна гіпотермія, лазерне випромінювання [10, 15].

Зазначенні способи не завжди виявляються ефективними, тому вивчення біологічних закономірностей репаративної регенерації кістки, пошук нових способів і засобів, що сприяють створенню умов для найкращого остеогенезу залишаються актуальними у ветеринарній хірургії.

Основою для нормального остеогенезу слугує відновлення мікроциркуляції і васкуляризації пошкоджених кісток. Відкриття оксиду азоту як універсального регулятора фізіологічних і біохімічних процесів та основного медіатора серцево-судинної системи [6] дало змогу по новому розглядати проблему репаративного остеогенезу. У вітчизняній ветеринарній медицині наразі відсутні дані про рівень та динаміку оксиду азоту в тварин із переломами кісток, його патогенетичне значення в репаративному остеогенезі та можливість фармакологічної корекції для оптимізації загоєння кісток.

Мета досліджень — вивчити зміни рівня оксиду азоту за переломів трубчастих кісток у собак. Оцінити вплив препарату «ІМУНОМ-ДЕПО» на рівень оксиду азоту у собак із переломами.

Матеріали і методи

Дослідження виконували на собаках різного віку та порід із переломами стегнової кістки. Тварин розділили на 2 групи: дослідну — 5 та контрольну — 5 голів. У собак обох груп проводили інтрамедулярний остеосинтез, антибіотикотерапію (цефазолін у дозі 10 мг/кг). Тваринам дослідної групи додатково вводили препарат «ІМУНОМ-ДЕПО», у дозі 1мл на тварину через 1 добу протягом 10 діб, починаючи з першої доби післяопераційного періоду.

«ІМУНОМ-ДЕПО» відноситься до групи імуномодельючих препаратів з вираженими антиоксидантними властивостями. У своєму складі «ІМУНОМ-ДЕПО» містить амінокислоту аргінін, що є джерелом утворення оксиду азоту.

Проби крові у тварин дослідної та контрольної груп відбирали на 1, 3, 7, 14 та 30-у добу лікування. В якості антикоагулянту використовували 3,8 % розчин лимоннокислого натрію у співвідношенні 9 : 1.

Кількість тромбоцитів, еритроцитів, лейкоцитів визначали загальноприйнятими методами, а концентрацію гемоглобіну — гемоглобін-ціанідним методом.

У пробах плазми спектрофотометрично визначали рівень фібриногену за Беліцером В. О. та Варецькою Т. В. 1997 [8]. Проводили оцінку протромбінового часу (ПЧ) за методом А. J. Quick [2] та активованого часткового тромбoplastинного часу (АЧТЧ) набором реактивів фірми «Ренам» (м. Москва, Росія).

Фібринолітичну ланку системи гемостазу досліджували методом фібринових пластин за Т. Astrupet J. Müllertz [1], який дає можливість одночасно визначити сумарну фібринолітичну активність (СФА), плазмінову активність (ПА) та активність тканинного активатора плазміногена (t-РА).

Рівень загального кальцію та неорганічного фосфору в сироватці крові визначали наборами реактивів фірми «Филисит-Диагностика», а кістковий ізофермент лужної фосфатази (КЛФ) — методом В. К. Вагнера зі співавт. [5].

Рівень оксиду азоту у сироватці крові визначали спектрофотометрично методом Гріна у модифікації Голікова [6] за сукупністю його стійких метаболітів — нітратів і нітритів.

Результати й обговорення

У тварин обох груп спостерігались зміни гематологічних показників (табл. 1), що характерні для розвитку запального процесу. У них спостерігали зниження кількості еритроцитів, концентрації гемоглобіну, розвивався лейкоцитоз. Концентрація загального кальцію в сироватці крові майже у тварин дослідної групи знизилась на першу — $1,4 \pm 0,23$ та третю добу лікування — $1,5 \pm 0,28$ мкмоль/л ($p < 0,05$). Вірогідних змін у концентрації неорганічного фосфору у тварин дослідної та контрольної груп не спостерігали.

Виявлено різниці у активності кісткового ізоферменту лужної фосфатази у тварин обох груп. У контрольній групі на першу добу лікування — $82,2 \pm 15,00$ Од/л, вона була вищою, ніж у дослідній групі — $41,8 \pm 8,74$ Од/л ($p < 0,05$). На третю добу активність КЛФ була однаковою в обох групах, а на сьому добу лікування у дослідній групі вона знизилася ($p < 0,001$) до $34,6 \pm 2,85$ Од/л, а тоді як у контрольній групі залишилася високою — $67,4 \pm 2,39$ Од/л. На чотирнадцяту та тридцяту добу лікування активність КЛФ в обох групах була однаковою.

Рівень NO_x у здорових собак становить $32,08 \pm 1,82$ мкмоль/л [16]. Після оперативного лікування виявлено різниці в динаміці оксиду азоту в контрольній та дослідній групах. У дослідній групі, рівень оксиду азоту у період застосування «ІМУНОМ-ДЕПО» був вищим, ніж у контрольній становив: на першу добу — $18,7 \pm 2,35$, на третю — $40,2 \pm 5,93$, на сьому — $38,6 \pm 2,35$ на чотирнадцяту — $30,3 \pm 1,06$, на тридцяту — $26,4 \pm 3,02$ мкмоль/л, тоді як у контрольній групі цей показник становив: на першу добу — $31,4 \pm 1,78$, на третю — $28,2 \pm 2,83$, на сьому — $23,9 \pm 1,18$ на чотирнадцяту — $39,9 \pm 1,60$, на тридцяту — $39,0 \pm 2,21$ мкмоль/л. Як видно із показників рівень оксиду азоту в дослідній групі.

Вміст фібриногену у тварин дослідної групи був нижчим, ніж у контролі впродовж усього періоду досліджень. Вірогідні різниці виявлено на першу та чотирнадцяту добу лікування. Рівень фібриногену у дослідній групі знизився до рівня здорових тварин на чотирнадцяту добу лікування, а у контрольній групі залишався високим до завершення. Це вказує на згасання запальних процесів у дослідній групі, що зумовлює більш швидкий початок репаративного остеогенезу.

Загальні коагуляційні тести — протромбіновий час (ПЧ) та активований частковий тромбoplastинний час (АЧТЧ), дають змогу оцінити вплив оксиду азоту на систему згортання крові, зокрема на її зовнішній та внутрішній шляхи активації. ПЧ у дослідній групі мав такі значення: на першу добу — $23,5 \pm 0,78$, на третю — $23,3 \pm 3,53$, на сьому — $26,4 \pm 0,80$, на чотирнадцяту — $26,1 \pm 0,45$, на тридцяту — $28,6 \pm 1,69$ сек. У тварин контрольної групи: на першу добу — $21,7 \pm 1,36$, на третю — $20,9 \pm 1,76$, на сьому — $20,8 \pm 1,63$, на чотирнадцяту — $18,9 \pm 0,86$, на тридцяту — $26,7 \pm 2,36$ сек. Як видно із цих показників ПЧ у дослідній групі мав тенденцію до подовження та вірогідно відрізнявся від групи контролю на сьому та чотирнадцяту добу лікування.

Показники АЧТЧ у дослідної групи були такими: на першу добу — $31,0 \pm 0,67$, на третю — $38,8 \pm 2,67$, на сьому — $42,4 \pm 1,52$, на чотирнадцяту — $61,1 \pm 1,35$, на тридцяту — $79,3 \pm 2,28$ сек. Відповідно у тварин контрольної групи: на першу добу — $37,8 \pm 3,55$, на третю — $33,0 \pm 5,55$, на сьому — $35,6 \pm 4,84$, на чотирнадцяту — $32,8 \pm 5,39$, на тридцяту — $30,3 \pm 7,65$ секунд.

Оксид азоту відноситься до групи ранніх атромбогенних сполук, які попереджують агрегацію тромбоцитів та вливають на тромбоутворення ще до появи тромбіну [4, 9]. Він пригнічує адгезію

клітин крові до стінки судин. Подовження ПЧ та АЧТЧ підтверджують антикоагуляційний ефект оксиду азоту у собак із переломами трубчастих кісток.

Сумарна фібринолітична активність у дослідній та контрольній групі вірогідно не відрізнялась протягом лікування, окрім першої доби, коли в контролі СФА становив $291,0 \pm 59,28$, а в дослідній групі — $480,9 \pm 56,09$ мм² ($p < 0,05$).

Проте відрізнялись плазмінова активність та активність тканинного активатора плазміногену. Так плазмінова активність у тварин дослідної групи становила: на першу добу — $19,3 \pm 45,05$, на третю — $115,2 \pm 29,64$, на сьому — $178,7 \pm 45,73$, на чотирнадцяту — $326,4 \pm 18,80$, на тридцяту — $162,1 \pm 26,90$ мм².

У тварин контрольної групи відповідно: на першу добу — $201,6 \pm 56,42$, на третю — $373,6 \pm 58,29$, на сьому — $380,6 \pm 41,21$, на чотирнадцяту — $316,0 \pm 23,72$, на тридцяту — $308,8 \pm 32,04$ мм². Як зазначає [3, 12], у системі фібринолізу провідне значення в генерації медіаторів запалення відіграє плазмін, саме він стимулює утворення кінінів, а продукти розщеплення фібринового згустку плазміном підвищують проникність дрібних судин.

Застосування тваринам «ІМУНОМ-ДЕПО» зменшує рівень плазмінової активності, відповідно і зменшується генерація кінінів та покращується кровообіг в мікроциркуляторному руслі.

Таблиця 1

Гематологічні показники, рівень загального кальцію, неорганічного фосфору та активність кісткового ізоферменту лужної фосфатази у собак із переломами трубчастих кісток

Термін дослідження	Гемоглобін, г/л	Еритроцити, Т/л	Лейкоцити, Г/л	Тромбоцити, тис./мкл	Са, мкмоль/л	Р, мкмоль/л	КЛФ, Од/л
1-а доба	<u>143,8±12,25</u>	<u>5,4±0,88</u>	<u>15,5±0,20</u>	<u>382,0±65,05</u>	<u>1,4±0,23</u>	<u>1,3±0,11</u>	<u>41,8±8,74</u>
	129,6±10,12	4,8±0,51	9,0±1,42**	265,0±30,00	1,9±0,07♦	1,2±0,14	82,2±15,00♦
3-я доба	<u>127,8±7,61</u>	<u>5,4±0,94</u>	<u>16,3±0,79</u>	<u>317,3±34,00</u>	<u>1,5±0,28</u>	<u>1,4±0,06</u>	<u>65,6±9,58</u>
	112,3±17,61	5,1±0,60	10,8±2,77♦	220,8±54,00	2,1±0,07♦	1,3±0,11	60,1±13,47
7-а доба	<u>116,0±7,93</u>	<u>5,1±0,58</u>	<u>13,2±1,54</u>	<u>621,0±20,00</u>	<u>1,9±0,43</u>	<u>1,2±0,11</u>	<u>34,6±2,85</u>
	110,40±11,42	5,0±0,63	15,1±2,00♦	434,8±22,55***	2,1±0,08	1,4±0,14	67,4±2,39***
14-а доба	<u>123,3±2,33</u>	<u>5,1±0,21</u>	<u>9,9±0,66</u>	<u>414,0±11,84</u>	<u>1,9±0,06</u>	<u>1,3±0,05</u>	<u>34,1±2,63</u>
	122,0±6,18	5,4±0,37	17,2±2,65*	494,3±62,76	1,9±0,13	1,4±0,15	45,4±6,29
30-а доба	<u>122,0±10,6</u>	<u>5,0±0,39</u>	<u>9,3±3,36</u>	<u>295,0±81,44</u>	<u>2,0±0,25</u>	<u>1,2±0,05</u>	<u>25,2±0,78</u>
	128,6±10,93	4,8±0,29	12,8±1,62	503,6±122,35*	2,1±0,15	1,5±0,15	21,7±1,36*
Здорові тварини	132,75±6,02	5,7±0,47	8,9±0,91	291,8±49,75	2,0±0,18	1,6±0,39	41,6±5,23

Примітки: у цій та наступній таблиці 1. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; — $p < 0,1$, порівняно з показниками контрольної групи;
2. Чисельник — дослідна (n=5), знаменник — контрольна група (n=5)

Таблиця 2

Динаміка гемостазіологічних показників та рівня оксиду азоту в собак за переломів кісток

Термін дослідження	Фібриноліз, мм ²			ПЧ, с	АЧТЧ, с	Fg, г/л	NO _x , мкмоль/л
	СФА	РА	t-ра				
1-а доба	<u>480,9±56,09</u>	<u>119,3±45,05</u>	<u>281,6±30,57</u>	<u>23,5±0,78</u>	<u>31,0±0,67</u>	<u>1,6±0,18</u>	<u>18,7±2,35</u>
	291,0±59,28*	201,6±56,42	89,4±12,73***	21,7±1,36	37,8±3,55	3,3±0,78♦	31,4±1,78**
3-я доба	<u>484,4±6,62</u>	<u>115,2±29,64</u>	<u>369,2±18,03</u>	<u>23,3±3,53</u>	<u>38,8±2,67</u>	<u>3,1±0,64</u>	<u>40,2±1,07</u>
	533,0±70,1	373,6±58,29**	159,4±26,58***	20,9±1,76	33,0±5,55	4,6±0,63	28,2±2,83**
7-а доба	<u>519,4±49,27</u>	<u>178,7±45,73</u>	<u>340,7±30,24</u>	<u>26,4±0,80</u>	<u>42,4±1,52</u>	<u>4,0±0,89</u>	<u>38,6±2,35</u>
	553,3±57,20	380,6±41,21*	172,7±15,54**	20,8±1,63*	35,6±4,84	4,1±0,84	23,9±1,18***
14-а доба	<u>501,7±28,6</u>	<u>326,4±18,80</u>	<u>175,3±11,08</u>	<u>26,1±0,45</u>	<u>61,1±1,35</u>	<u>1,3±0,38</u>	<u>30,3±1,06</u>
	515,8±72,2	316,0±23,72	199,8±22,74	18,9±0,86***	32,8±5,39***	3,3±0,58*	39,9±1,60***
30-а доба	<u>474,4±28,30</u>	<u>162,1±26,90</u>	<u>312,3±24,53</u>	<u>28,6±1,69</u>	<u>79,3±2,28</u>	<u>1,3±0,21</u>	<u>26,4±3,02</u>
	556,0±90,07	308,8±32,04**	247,2±19,21♦	26,7±2,36	30,3±7,65***	2,7±1,00	39,0±2,21*
Здорові тварини	675,3±19,5	234,3±12,3	440,9±14,4	21,7±1,20	38,6±3,14	1,3±0,42	34,8±3,23

Рівні тканинного активатора плазміногену (t-ра) у дослідній та контрольній групах також мали відмінність. Так, у дослідній групі його активність становила: на першу добу — $281,6 \pm 30,57$, на третю — $369,2 \pm 18,03$, на сьому — $340,7 \pm 30,24$, на чотирнадцяту — $175,3 \pm 11,08$, на тридцяту — $312,3 \pm 24,53$ мм². У контрольній групі відповідно: на першу добу — $89,4 \pm 12,73$, на третю — $159,4 \pm 26,58$, на сьому — $172,7 \pm 15,54$, на чотирнадцяту — $199,8 \pm 22,74$, на тридцяту — $247,2 \pm 19,21$ мм². Тканинний активатор плазміногену — фермент, що постійно продукується клітинами ендотелію судин, його активність вказує на стан секреторної здатності ендотелію. Застосування препарату «ІМУНОМ-ДЕПО» підвищує рівень оксиду азоту, що покращує секреторну здатність ендотелію та відповідно прискорює процес регенерації кісток.

Висновки

1. У собак за переломів трубчастих кісток та розвитку запально-регенеративного процесу спостерігається дисфункція ендотелію, що проявляється зниженням синтезу оксиду азоту та тканинного активатора плазміногену.
2. Застосування імуностимулюючого препарату «ІМУНОМ-ДЕПО» покращує секреторну функцію ендотелію, підвищуючи рівень оксиду азоту та тканинного активатора плазміногену.
3. Використання препарату «ІМУНОМ-ДЕПО» за переломів трубчастих кісток у собак покращує трофіку та мікроциркуляцію в пошкоджених тканинах, що забезпечуються антитромбогенними властивостями оксиду азоту.

V. S. Shaganenk, M. V. Rublenko

PATHOGENIC ROLE OF NITRIC OXIDE IN REPARATIVE OSTEOGENESIS AND ITS CORRECTION «IMMUNE-DEPO»

S u m m a r y

The found changes in levels of nitric oxide and its dynamics in fractures of bones dogs. Found changes between the levels of nitric oxide and hemostasis parameters, especially when using the «Immune-Depo». Using the latter increases the levels of nitric oxide activates the endothelial release of tissue plasminogen activator, which helps to improve blood circulation in the tissue injury and promotes more rapid recovery of animal.

V. S. Шаганенко, М. В. Рубленко

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В УСЛОВИЯХ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА И ЕГО КОРРЕКЦИЯ ПРЕПАРАТОМ «ИМУНОМ-ДЭПО»

А н н о т а ц и я

Исследовано изменения уровня оксида азота и его динамика при переломах трубчатых костей у собак. Найдено влияние уровня оксида азота на показатели гемостаза, особенно при использовании препарата «Имуно-Дэпо». Использование последнего повышает уровень оксида азота, активирует выделение эндотелием тканевого активатора плазминогена, что способствует улучшению циркуляции крови в травмированных тканях и способствует более быстрому выздоровлению животного.

1. *Astrup T.* The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity / T. Astrup, S. Müllertz // Arch. Biochem. Biophys. — 1952. — Vol. 40. — P. 346–351.
2. *Quik A. J.* Hemorrhagic Diseases and Pathology of Hemostasis / A.J. Quik. — Springfield. — 1974. — P. 111
3. *Андрієць В. Г.* Судинно-тромбоцитарний гемостаз та його корекція при абдомінальній хірургічній патології у собак і свиней: дис. кандидата вет. наук: спец. 16.00.05 «Ветеринарна хірургія» / В. Г. Андрієць. — Біла Церква, 2009. — 226 С.
4. *Андронов Е. В.* Роль оксида азота в регуляції мікроциркуляторного звена системи гемостаза / Е. В. Антонов, В. Ф. Кирич, А. Н. Иванов, Н. В. Мамонтова // Саратовский науч.-мед. жур. — 2007. — №3. — С.39–42
5. *Вагнер В. К.* Методы и результаты исследования изоферментов (кишечной и печеночной фракций) сывороточной щелочной фосфатазы при острых хирургических заболеваниях органов брюшной полости / В. К. Вагнер, В. М. Путилин, Г. Г. Харабуга // Вопр. мед. химии. — 1981. — 27, № 6. — С. 752–754.
6. *Голиков П. П.* Оксид азота в клинике неотложных заболеваний. / П. П. Голиков. — М: ИД Медпрактика-М, 2004. — 180 с.
7. *Долгов В. В.* Лабораторная диагностика нарушений гемостаза / В. В. Долгов, П. В. Свиринов. — М.-Тверь : ООО «Издательство «Триада», 2005. — 227 с.

8. Кількісне визначення фібриногену в плазмі крові людини / В. О. Беліцер, Т. В. Варецька, К. М. Веремєєнко та ін. // *Лабор. діагностика*. — 1997. — №2. — С. 53–55.
9. *Котюжинська С. Г.* Роль оксиду азоту в регуляції агрегатного стану крові: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 14.03.04 «Патологічна фізіологія» / С. Г. Котюжинська. — Одеса, 2003.— 16 с.
10. *Петренко О. Ф.* Рациональні методи остеосинтезу та стимуляція репаративного остеогенезу у тварин: автореф. дис. на здоб. наук. ступеня. д-ра вет. наук: 16.00.05 «Ветеринарна хірургія» / О. Ф. Петренко. — Біла Церква, 2002. — 34с.
11. *Пустовіт Р. В.* Гемостаз та його корекція при переломах трубчастих кісток у собак: дис. канд. вет. наук: 16.00.05 / Р. В. Пустовіт. — Біла Церква, 2008.— 236 с.
12. *Волков Г. Л.* Система фібринолізу плазми крові / Современные представления о системе гемостаза // Г. Л. Волков, Т. Н. Платонова, А. Н. Савчук и др. — К. : Наукова думка, 2005. — С. 141–174.
13. *Смурна О. В.* Застосування екстракортикального остеосинтезу та гідроксилапатиту «кергап» при переломах клубової кістки у собак: автореф. дис. на здоб. наук. ступеня канд. вет. наук: спец. 16.00.05 «Ветеринарна хірургія» / О. В. Смурна. — Біла Церква, 2009.— 25 с.
14. *Сомова Л. М.* Оксид азота как медиатор воспаления / Л. М. Сомова, Н. Г. Плехова // *Вестник ДВО РАН*. — 2006.— №2.— С.77–80.
15. *Циулина Е. П.* Стимуляція репаративного остеогенеза методом лазерної остеоперфорации при лечении переломов трубчатых костей у собак: автореф. на получ. степени канд. вет. наук: 16.00.05 «Ветеринарная хирургия» / Е. П. Циулина. — Троицк, 2004. — 129 с.
16. *Рубленко М. В.* Методичні аспекти вивчення клініко-патогенетичного значення оксиду азоту у тварин / М. В. Рубленко, В. С. Шаганенко // *Вісник БНАУ*. — 2010.— 30 с.

Рецензент: завідувач лабораторії ембріональної біотехнології, кандидат біологічних наук, с. н. с. Гевкан І. І.