



На правах рукописи

Стрижиков
Виталий Викторович

**Лазерная остеоперфорация как
способ стимуляции гемопоэза при
острой лучевой болезни у собак**
(клинико-экспериментальные исследования)

16.00 05 – ветеринарная хирургия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Троицк – 2007

Работа выполнена в ФГОУ ВПО «Уральская государственная академия ветеринарной медицины»

Научный руководитель доктор ветеринарных наук, профессор
Молоканов Владимир Алексеевич

Официальные оппоненты доктор ветеринарных наук, профессор
Храмов Юрий Васильевич
кандидат ветеринарных наук, доцент
Самчук Валерий Иванович

Ведущая организация ФГОУ ВПО «Уральская государственная сельскохозяйственная академия»

Защита состоится « 28 » мая 2007 г в « 10 » часов на заседании диссертационного совета Д 220 066 01 в ФГОУ ВПО «Уральская государственная академия ветеринарной медицины» адрес 457100, г Троицк, Челябинская область, ул Гагарина 13, тел 2-27-16

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО «Уральская государственная академия ветеринарной медицины»

Автореферат разослан « 10 » апреля 2007 г

Учёный секретарь
диссертационного совета



Лыкасова И А

1. Общая характеристика работы

Актуальность темы. Лазеры, с момента своего появления все шире применяются в различных областях человеческой деятельности. Они давно используются в медицинской практике и показали свою высокую эффективность при лечении достаточно широкого круга патологий (Б И Хубутия, 1988, Н Д Гладкова, 1989, В И Козлов, 1992, С В Грачев, 1993, М З Крейман, 1993, В И Корепанов, 1994, David G Baxter, 1994, Н Ф Гамалея, 1972, 1996, А К Полонский, 1996, О К Скобелкин, 1989, 1996, В Е Илларионов, 1992, 1993, 1998, В А Шуховцев, 1998). В настоящее время наблюдается интенсивное внедрение лазерной техники в биологических исследованиях и практической ветеринарии (Н С Панько, 1987, С А Богданов, 1995, В П Иноземцева, 1997, С В Полянский, 2004). В силу своих уникальных свойств, лазерное излучение оказывает разностороннее влияние на организм. В частности, при воздействии на биологические ткани лазерное излучение улучшает микроциркуляцию, активизирует окислительно-восстановительные процессы, повышает уровень обмена веществ и резистентность организма, стимулирует репаративные процессы, обладает иммунокоррегирующим и противовоспалительным действием, ускоряет срастание переломов и заживление ран, усиливает антиоксидантную защиту организма, нормализует процессы возбуждения и торможения в центральной нервной системе (А А Прохончуков, 1980, Л В Михайлова и др., 1987, В С Земсков, 1988, С И Болтрукович, 1989, В Д Илларионов, 1990, В И Рузов, 1991, П И Толстых, 1991, А Н Михайлов, 2001, Н Б Амиров, 2002, Л В Астахова и др., 2003). В связи с этим, в течении последних 20-30 лет при лечении широкого спектра патологий применялись низкоинтенсивные лазеры. Однако, на сегодняшний день все большее распространение получают высокоинтенсивные лазеры. Они оказались чрезвычайно эффективными при лечении таких тяжелых патологий, как острый и хронический остеомиелит, переломы (В А Привалов, 1998, 1999, 2001, И В Крочек, 2001, 2003, 2004, В А Молоканов, 2003, Е П Циулина, 2003, 2004). Несмотря на полученные положительные результаты от применения высокоинтенсивных лазеров, их влияние на организм человека и животных до сих пор остается малоисследованным и требует детального изучения.

Цель и задачи исследования. Целью работы явилось изучение влияния остеоперфорации высокоинтенсивным инфракрасным лазером на состояние гемопоэза и морфофункциональные изменения красного костного мозга у собак на фоне острой лучевой болезни.

Для реализации этой цели поставлены следующие задачи:

1. Разработать и экспериментально обосновать способ стимуляции гемопоэтической функции красного костного мозга при острой лучевой болезни методом лазерной остеоперфорации,
2. Изучить состояние гемопоэза и морфофункциональные изменения клеток красного костного мозга при лазерной остеоперфорации у здоровых собак и на фоне острой лучевой болезни,
3. Установить особенности течения репаративного процесса в красном костном мозге у собак при лучевой болезни на фоне лазерной остеоперфорации.

Научная новизна. В работе, на большом фактическом материале, с использованием комплекса методов впервые изучены особенности стимуляции гемопоэза с помощью высокоинтенсивного инфракрасного диодного лазера у здоровых собак и на фоне острой

лучевой болезни

Впервые предложен и внедрен в ветеринарную практику метод лазерной остеоперфорации у мелких домашних животных, защищенный Патентом на изобретение РФ «Способ стимуляции гемопоэза у животных», №2290231 от 27 12 2006, а также «Способ стимуляции репаративного остеогенеза», №2255700, от 10 07 2005, получено положительное решение экспертизы по существу по заявке на патент «Способ стимуляции гемопоэза у животных при лучевой болезни», №2006134385 от 19 10 2006 г

Теоретическая и практическая значимость. Выявлен комплекс морфофункциональных изменений системы гемопоэза в красном костном мозге на фоне лазерной остеоперфорации и ионизирующего облучения. Полученные данные расширяют и дополняют отдельные положения теории изменения систем организма при острой лучевой болезни

На основании проведенных комплексных исследований для практического использования предложена новая методика стимуляции гемопоэза в красном костном мозге на фоне острой лучевой болезни у собак

Изложенный в диссертации материал может быть использован в учебном процессе и научной работе вузов, при чтении лекций и проведении практических занятий со студентами ветеринарных и биологических факультетов

Апробация результатов научных исследований. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на Международной научно-практической конференции, посвященной 10-летию кинологического центра УГАВМ «Актуальные проблемы биологии и ветеринарной медицины мелких домашних животных» 19-20 мая 2005 г (Троицк, 2005), IX научно-практической конференции, посвященной 75-летию УГАВМ «Перспективные направления научных исследований молодых ученых» 9-11 ноября (Троицк, 2005), 2-й Всероссийской конференции молодых ученых «Молодые ученые – сельскому хозяйству России» (Москва, 2005), на ежегодных итоговых внутривузовских конференциях УГАВМ (Троицк, 2004-2006)

Реализация результатов исследований. Результаты научных исследований используются в учебном процессе и научно-исследовательской работе кафедр хирургии Оренбургского и Воронежского государственных аграрных университетов, Курской и Ульяновской государственных сельскохозяйственных академий, Витебской ордена «Знак Почета» и Уральской государственных академий ветеринарной медицины, используются в работе Челябинской городской клинической больницы № 1

Основные положения, выносимые на защиту:

- 1 Динамика гематологических показателей при лазерной остеоперфорации у здоровых собак,
- 2 Стимуляция гемопоэза в красном костном мозге методом лазерной остеоперфорации у здоровых собак,
- 3 Динамика гематологических показателей и морфофункциональных изменений в красном костном мозге на фоне острой лучевой болезни,
- 4 Стимуляция гемопоэза в красном костном мозге методом лазерной остеоперфорации у собак на фоне острой лучевой болезни

Публикации. Основные материалы диссертационной работы опубликованы в 7 статьях По материалам работы получено 2 патента Патент на изобретение РФ «Способ стимуляции гемопоэза у животных», №2290231 от 27 12 2006, «Способ стимуляции репаративного остеогенеза», №2255700 от 10 07 2005

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 147 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания собственных исследований, обсуждения результатов исследований, выводов, практических предложений, списка литературы и приложения Список литературы включает 162 источника, в том числе 20 – зарубежных авторов Материал иллюстрирован 31 графиком, 8 фотографиями и 14 таблицами

2. Результаты собственных исследований

2. 1. Материал и методы исследования

Работа проводилась с 2004 по 2006 гг в условиях кафедры хирургии УГАВМ

Экспериментальные исследования проводили на 55 беспородных собаках, подобранных по принципу аналогов вес – 12-14 кг, возраст – 2-3 года

Животные содержались в индивидуальных клетках в условиях вивария УГАВМ Кормили собак 2 раза в день Исходя из задач исследования, проводилось четыре серии опытов

В первой серии опытов изучалось состояние гемопоэза на фоне острой лучевой болезни (работа проводилась совместно с аспирантами кафедры хирургии УГАВМ Р В Михайленко и Д А Пашниным)

С целью изучения симптоматики протекания лучевой болезни была сформирована группа собак из 10 голов Животные под действием миорелаксантов подверглись тотальному рентгеновскому облучению на рентгеновском аппарате «Рентген – 30» в дозе 300 рентген

Во второй серии опытов изучалось влияние лазерной остеоперфорации на гемопоэз у здоровых собак (первая опытная группа) Была сформирована группа собак из 15 голов Всем животным, под действием миорелаксантов, производилось однократное нанесение остеоперфораций в костях поясов грудной и тазовой конечностей (лопатка, подвздошная и седалищные кости), эпифизов трубчатых костей грудной и тазовой конечностей (плечевая, лучевая, локтевая, бедренная, большая и малая берцовые кости, пяточная) с двух сторон, и грудине в течение 2-3 секунд в 2-3 точках на каждый эпифиз и кость пояса конечности на расстоянии 10-15 мм друг от друга (Рис 1)

Использовался инфракрасный диодный лазер ЛС-097 ИРЭ ПОЛЮС в импульсно-периодическом режиме 100×50, с длиной волны 970 нм, при мощности 25 Вт Доставка энергии осуществляется чрескожно, контактным путем, посредством моноволоконного кварцевого световода диаметром 0,4 мм с термостойким защитным покрытием При этом формировались сквозные перфорационные отверстия в зоне эпифизов костей в перпендикулярных плоскостях

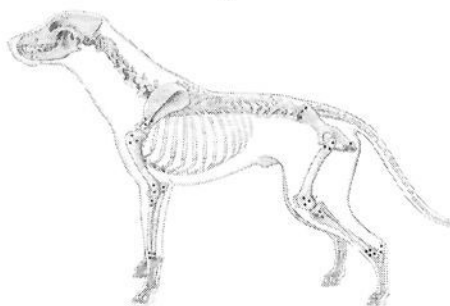


Рис. 1. Схема расположения точек при лазерной остеоперфорации.

В третьей серии опытов изучалось влияние лазерной остеоперфорации на гемопоэз у собак, подвергнутых рентгеновскому облучению (вторая опытная группа). Была сформирована группа собак из 15 голов. Через 7 суток после рентгеновского облучения в дозе 300 рентген производилась однократная лазерная остеоперфорация по схеме, указанной для первой серии опытов.

В четвертой серии опытов изучалось влияние двукратной лазерной остеоперфорации на состояние гемопоэза на фоне острой лучевой болезни (третья опытная группа 15 голов собак). Через 7 суток после рентгеновского облучения в дозе 300 рентген производилась однократная лазерная остеоперфорация по схеме, указанной для первой серии опытов. Через 3 недели после первой лазерной остеоперфорации была проведена повторная лазерная остеоперфорация костей по той же методике.

Перед постановкой опытов осуществляли контроль за клиническим состоянием животных путем визуального осмотра, измерением температуры тела, частоты дыхательных движений в минуту, подсчета пульса.

Исследования собак производились до перфорации дважды и через 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42 и 56 суток после остеоперфорации. Проводимое исследование включало в себя:

1. Контроль за живой массой и динамикой ее изменений;
2. Исследование крови: Для исследований кровь брали утром, перед кормлением из подкожной вены предплечья (*v. cephalica accessoria*) или из латеральной вены сафена (*v. saphena lateralis*), кровь стабилизировали гепарином. Кровь бралась до опыта дважды, а затем на 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42 и 56 сутки.
3. В крови определяли:
 - 3.1. Количество эритроцитов и лейкоцитов — подсчетом в камере Горяева (Й. Тодерв, 1963);
 - 3.2. Концентрацию гемоглобина — унифицированным гемоглобинцианидным методом (1978);
 - 3.3. Гематокритный обмен — по Е.А. Захарову, О.Т. Подгородниковой (1975);
 - 3.4. Расчетным путем определялось среднее содержание гемоглобина в эритроците
 - 3.5. Концентрация гемоглобина в эритроците;
 - 3.6. Средний объем эритроцита.

4 У собак проводилось получение пунктата костного мозга (по А В Васильеву, 1979) На изготовленных мазках костного мозга изучался клеточный состав костного мозга

Полученный цифровой материал подвергнут статистической обработке, проводимой общепринятыми методами вариационной статистики по И Т Шевченко и соавт. (1970) и Е В Гублер (1979) Расчет производили на персональном компьютере с использованием программ Biostat, SPSS 13.0 for Windows, Microsoft Excel 2002 Доверительную вероятность (P) находили с учетом числа имеющихся наблюдений Различия считали статистически достоверными при $P \leq 0,05$

2.2. Влияние ионизирующего облучения на состояние гемопоэза у собак

В результате проведенных исследований установлено, что общее рентгеновское облучение собак в дозе 300 рентген не оказывало достоверного влияния на количество эритроцитов в периферической крови животных

Количество лейкоцитов у облученных собак после рентгеновского облучения достоверно снижалось Минимальное содержание лейкоцитов наблюдалось на 21 сутки опыта При последующем наблюдении происходило постепенное восстановление изучаемого показателя

По сравнению с собаками 2 и 3 опытных групп достоверные различия наблюдались на 35, 42, 56 сутки опыта У собак опытных групп происходило более быстрое восстановление количества лейкоцитов в периферической крови и по этому показателю они превосходили группу облученных собак на 50-70%

Рентгеновское облучение не вызывало достоверных изменений содержания гемоглобина в крови облученных собак, на протяжении всего опыта

Межгрупповые различия наблюдались на 28, 35, 42, 56 сутки опыта Во все отмеченные периоды показатели облученных собак группы были на 17-33% достоверно ниже показателей 2 и 3 опытных групп

Средний объем эритроцитов у облученных собак под действием рентгеновского облучения был достоверно ниже фона на 7 и 14 сутки Начиная с 28 суток средний объем эритроцитов увеличивался и на 42 сутки он не отличался от фонового уровня

Межгрупповые различия в значении среднего объема эритроцитов отмечались на 7, 14, 35, 42 сутки На 7 и 14 сутки показатели опытных групп превосходили показатели облученных животных на 17-24% На 35 и 42 сутки наблюдалась противоположная картина – показатели облученных собак превосходили опытные группы на 20-25%

Содержание гемоглобина в эритроците под действием рентгеновского облучения на 7 сутки было достоверно ниже фонового уровня, а на 14 сутки достигало минимальных значений Начиная с 21 суток происходило увеличение этого показателя и на 35 сутки отличие от фонового значения было недостоверным

Межгрупповые различия в содержании гемоглобина в эритроците отмечались на 7, 14, 42 сутки наблюдения В эти периоды показатели опытных групп были на 15-25% выше показателей облученных собак

Концентрация гемоглобина в эритроцитах у облученных собак достоверно повышалась до 14 дня опыта. В последующие периоды происходило снижение данного показателя и на 35 сутки опыта достоверных отличий от фона не наблюдалось.

Полученные нами результаты согласуются с данными Н.А. Куршакова, (1955), Л.О. Джекобсона, (1960), А.К. Гуськовой, (1971), А.Д. Белова, (1981), А.И. Воробьева, (1986), В.А. Киришина, (1986), Ю.Б. Кудряшова, (1983, 1987), С.П. Ярмоненко, (1998), Г.И. Алексеева, (1986, 1990).

2.3. Влияние лазерной остеоперфорации на гемопоэз у здоровых собак

Лазерная остеоперфорация костей по описанной методике у здоровых собак начиная с 7 суток опыта вызывает достоверное повышение содержания в периферической крови эритроцитов. При последующем наблюдении, начиная с 42 суток опыта, количество эритроцитов снижалось и на 56 сутки опыта различия с фоновыми значениями были недостоверны. Повышение количества эритроцитов в крови на 7 и 14 сутки опыта можно объяснить усиленным выбросом их из костномозгового депо, а в последующие сроки (после 21 суток) – со стимулирующим влиянием остеоперфорации на гемопоэз.

Остеоперфорация вызывает выраженное увеличение количества лейкоцитов в крови, начиная с 3 суток и на 7 сутки этот показатель становится на 33% выше фонового значения. До 28 суток опыта количество лейкоцитов в крови остается практически без изменений, а затем снижается до фоновых значений. Такую динамику лейкоцитов можно объяснить стимулирующим влиянием лазерного излучения на лейкопоэз.

Концентрация гемоглобина в крови собак первой опытной группы после проведения остеоперфорации достоверно снижалась на 3 и 28 сутки. В остальные периоды она достоверно не отличалась от фонового уровня. Мы связываем это с тем, что под воздействием остеоперфорации средний объем эритроцита достоверно снижался. Одновременно с этим, начиная с 3 суток опыта, достоверно снижалось содержание гемоглобина в эритроците и достигало минимального значения на 28 сутки опыта. Также нами выявлена тенденция к снижению концентрации гемоглобина в эритроците на 3 сутки после проведения лазерной остеоперфорации и тенденция к повышению данного показателя на 14 сутки опыта, совпадающие по времени с понижением и повышением концентрации гемоглобина в периферической крови.

Таким образом, лазерная остеоперфорация эпифизов костей у здоровых животных вызывает значительное повышение количества эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина в периферической крови. Максимальное увеличение данных показателей наблюдается на 21-28 сутки опыта. Снижение среднего объема эритроцита говорит о выбросе молодых клеток из костного мозга и усилении эритропоэза, а увеличение концентрации гемоглобина в них – о благоприятных условиях, способствующих его усиленному синтезу.

2.4. Влияние лазерной остеоперфорации на состояние гемопоэза у собак на фоне острой лучевой болезни

У животных второй опытной группы, как и у животных предыдущей группы, про-

ведение рентгеновского облучения не вызывало достоверных изменений количества эритроцитов. После проведения лазерной остеоперфорации происходило резкое увеличение количества эритроцитов в крови на 21 сутки опыта и их количество достигало максимальных значений на 28 сутки опыта. Мы связываем это со стимулирующим влиянием лазерной остеоперфорации на клетки-предшественники эритропоэза. Так, наблюдаемые нами изменения происходили через 14 суток после проведения остеоперфорации, как раз такой период времени необходим для дифференцировки эритроцитов в костном мозге. В последующий период количество эритроцитов снижалось, но до 56 суток опыта оставалось на 27-30% выше фонового уровня.

Динамика лейкоцитов у собак второй опытной группы носила следующий характер. Рентгеновское облучение уже на 3 и 7 сутки вызывало резкое достоверное снижение количества лейкоцитов. После проведения лазерной остеоперфорации происходило еще большее снижение их количества, которое достигало минимума на 14 сутки. С 28 дня наблюдения происходило восстановление численности изучаемых клеток, которое продолжалось до 56 дня. При этом темпы восстановления количества лейкоцитов были значительно выше, чем у животных, не прошедших лазерную остеоперфорацию.

Концентрация гемоглобина после проведения лазерной остеоперфорации, достоверно повышалась начиная с 28 суток и достигала максимального значения на 42 сутки. Мы связываем это с тем, что хотя остеоперфорация и вызывала снижение содержания гемоглобина в эритроцитах (с 21 по 35 сутки на 20%) за счет достоверного уменьшения их объема на 21-42 сутки, но общее количество эритроцитов увеличивалось.

Концентрация гемоглобина в эритроцитах после лазерной остеоперфорации с 21 суток опыта достоверно увеличивалась на 7,39%. Такое повышение было непродолжительным и уже на 35 сутки достоверных отличий от фонового значения не отмечалось.

Таким образом, проведение лазерной остеоперфорации на фоне острой лучевой болезни способствует более быстрому восстановлению количества лейкоцитов в периферической крови, а также резкому увеличению количества эритроцитов и концентрации гемоглобина в крови в результате усиления гемопоэтической функции красного костного мозга.

2.5. Влияние двукратной лазерной остеоперфорации на состояние гемопоэза у собак на фоне ионизирующего облучения

У собак третьей опытной группы лазерная остеоперфорация способствовала резкому повышению количества эритроцитов на 21 сутки опыта. Максимального значения данный показатель достигал на 28 сутки опыта. Повторная остеоперфорация на 35 сутки вызывала снижение количества эритроцитов в крови, которое продолжалось до 56 суток. По сравнению с животными второй опытной группы, после повторной остеоперфорации происходит более резкое снижение эритроцитов в периферической крови на 42 и особенно на 56 сутки наблюдения.

Количество лейкоцитов в крови собак третьей опытной группы на фоне рентгеновского облучения резко снижалось. После проведения лазерной остеоперфорации этот показатель еще более снизился и на 14 сутки достиг минимального значения. С 21 суток

опыта происходило восстановление количества лейкоцитов в крови. Проведение повторной остеоперфорации ускорило восстановление численности лейкоцитов и на 56 сутки достоверных отличий от фоновых значений не наблюдалось.

По сравнению с животными второй группы, проведение повторной лазерной остеоперфорации способствует более быстрому восстановлению в крови количества лейкоцитов. Так, начиная с 42 суток опыта, рост данного показателя у собак 3 группы достоверно опережает таковой 2 группы.

Достоверных межгрупповых различий в динамике концентрации гемоглобина в крови и среднего объема эритроцита между собаками 2 и 3 опытных групп на протяжении всего эксперимента не наблюдалось.

Содержание гемоглобина в эритроцитах под действием лазерной остеоперфорации увеличивалось до 14 суток опыта. На 21 сутки происходило резкое снижение и на 28 сутки этот показатель достигал своего минимальных значений (на 25,05% ниже фонового уровня). В дальнейшем происходило увеличение содержания гемоглобина в эритроците и на 35 сутки достоверных отличий от фоновых значений не наблюдалось.

Достоверные различия между животными 2 и 3 опытных групп наблюдались только на 56 сутки. В этот период цветной показатель у собак 3 группы достоверно превосходил показатели животных 2 группы на 13,97%.

Концентрация гемоглобина в эритроците при воздействии лазерной остеоперфорации кратковременно, достоверно снижалась (на 21 сутки). Уже через 7 дней данный показатель вернулся к фоновому уровню.

Проведение повторной остеоперфорации вызвало стойкое высокодостоверное увеличение концентрации гемоглобина в эритроцитах на 42 сутки, которое сохранялось до конца наблюдения. Достоверные межгрупповые различия отмечались на 21 и 42 сутки. На 21 сутки преобладали показатели 2 группы, а на 42 сутки – показатели 3 группы.

Обобщая полученные данные, можно отметить, что проведение повторной остеоперфорации вызывает, по сравнению с однократной остеоперфорацией, более быстрое и полное восстановление количества лейкоцитов. Вместе с тем, проведение повторной остеоперфорации вызывало более резкое снижение количества эритроцитов в крови и снижение его среднего объема, что говорит о более выраженном стимулирующем влиянии на белый росток костного мозга.

2.6. Влияние лазерной остеоперфорации и ионизирующего облучения на состояние костного мозга собак

2.6.1. Распределение нейтрофилов костного мозга по степени созревания

В костном мозге до начала эксперимента у всех животных форма кривой распределения нейтрофилов по степени созревания была одинаковой. Наибольший удельный вес у всех животных приходится на палочкоядерные нейтрофилы, несколько ниже – сегментоядерные. Содержание молодых форм клеток значительно ниже.

Проведение лазерной остеоперфорации вызывает выраженный сдвиг кривой вправо. У животных первой группы на 3 сутки после остеоперфорации наблюдается выраженное увеличение количества сегментоядерных нейтрофилов. В то же время достовер-

ных изменений содержания в костном мозге более молодых форм нейтрофилов не происходит. На 7 сутки опыта отмечается снижение количества зрелых форм нейтрофилов.

На 14 сутки форма распределения нейтрофилов по степени созревания полностью восстанавливается. Исчезают выраженные различия между показателями собак на 14 сутки опыта и этих же животных до остеоперфорации.

Таким образом, можно отметить, что лазерная остеоперфорация сопровождалась усиленным выбросом созревающих и зрелых форм нейтрофилов из костного мозга в кровяное русло. По этой причине ускорялось созревание молодых форм клеток костного мозга на поздних стадиях нейтрофиллопоэза и происходил кратковременный сдвиг нейтрофиллограммы вправо. После выхода зрелых клеток в кровяное русло, форма нейтрофиллограммы у животных полностью восстанавливалась. Проводимая остеоперфорация не оказывала влияния на скорость созревания молодых форм клеток на ранних этапах нейтрофиллопоэза, содержание в костном мозге и соотношения между ними до и после остеоперфорации практически не изменялось.

В последующие дни опыта у животных первой опытной группы наблюдаются колебания в содержании палочко- и сегментоядерных нейтрофилов. Эти колебания можно объяснить периодическим выбросом нейтрофилов в кровяное русло, на фоне лазерной остеоперфорации наблюдается типичный циклический ритм нейтрофиллопоэза.

У собак второй и третьей опытных групп рентгеновское облучение вызывает гибель малодифференцированных активно делящихся клеток и появляются изменения среди молодых форм клеток костного мозга. Снижение количества первых трех генераций нейтрофилов (промиелоцитов, миелоцитов и метамиелоцитов) кратковременно, уже на 3 сутки оно компенсируется и левая часть нейтрофиллограммы восстанавливается. Изменения в правой части нейтрофиллограммы оказываются более выраженными и процессы компенсации протекают медленнее. Так, у животных второй и третьей группы восстановление содержания сегментоядерных нейтрофилов происходит только на 7 сутки опыта, а палочкоядерных – на 14 сутки. Лазерная остеоперфорация вызвала сдвиг кривой созревания нейтрофилов вправо, увеличивая содержание сегментоядерных нейтрофилов, однако общий уровень этих изменений оказывается не таким большим, как у собак первой группы.

У животных второй опытной группы форма распределения нейтрофилов по степени созревания восстанавливается на 28 сутки, однако количество палочко- и сегментоядерных нейтрофилов ниже фоновых значений и показателей животных первой группы. В дальнейшем наблюдаются колебания в содержании палочко- и сегментоядерных нейтрофилов, которые, как и у животных первой группы, можно объяснить периодическим выбросом нейтрофилов в кровяное русло.

У собак третьей опытной группы повторная остеоперфорация на 28 сутки вызывает повторное снижение содержания палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, содержание более молодых форм клеток не изменяется. К 35 суткам опыта исходная форма нейтрофиллограммы восстанавливается, а количество промиелоцитов, миелоцитов и метамиелоцитов достигает самых высоких значений за все время эксперимента. К 42 суткам содержание палочкоядерных нейтрофилов в костном мозге становится выше нормы.

По нашему мнению, такое повышение вызвано усиленным созреванием стволовых комитированных клеток нейтрофильного ряда после повторной остеоперфорации

Последующие изменения нейтрофиллопоза связаны с более низким содержанием палочкояденых и сегментоядерных нейтрофилов в костном мозге. Удельный вес этих клеток был на 30-38% ниже данных до начала эксперимента

2.6.2. Распределение лимфоцитов костного мозга по степени созревания

Рентгеновское облучение собак второй и третьей групп вызывает быстрое кратковременное повышение удельного веса лимфоцитов в костном мозге на 30% от исходного уровня. Через 7 суток после облучения содержание лимфоцитов нормализуется. У собак второй группы (облучение и однократная остеоперфорация) – достоверные изменения, по отношению к фоновым данным, отсутствуют до конца опыта, но отмечается тенденция к снижению уровня данного показателя после остеоперфорации, которая сохраняется до 28-х суток опыта

Проводимая на 28 сутки опыта повторная лазерная остеоперфорация у собак 3 группы совпадала по времени с наиболее низким уровнем лимфоцитов костного мозга и вызывала еще большее снижение данного показателя, минимум которого приходился на 35 сутки

У животных первой опытной группы остеоперфорация способствовала резкому и быстрому подъему лимфоцитов в костном мозге. На 14 сутки опыта этот показатель вырос в 2,1 раза. Такое повышение было кратковременным и уже на 21 сутки количество лимфоцитов костного мозга снизилось до фоновых значений и последующие изменения были недостоверными. Двукратная остеоперфорация у собак после рентгеновского облучения способствовала длительной и стойкой депрессии лимфоцитопоза. Удельный вес этих клеток в костном мозге с 7 по 35 дни стойко держался на самом низком уровне. Стойкое снижение уровня лимфоцитов не нарушало способность костного мозга к регенерации. Уже спустя неделю, после повторной остеоперфорации уровень этих клеток нормализуется. При этом увеличивается и скорость регенерации. Если после первой перфорации восстановление лимфоцитопоза заняло более пяти недель, то после повторной остеоперфорации восстановление происходит в течение одной недели.

2.6.3. Распределение базофилов костного мозга по степени созревания

Однократная лазерная остеоперфорация не оказывает выраженного воздействия на динамику содержания базофилов в костном мозге у собак до 42 суток опыта. На 42 сутки происходит достоверное повышение уровня базофилов в 1,74 раза ($P < 0,1$), но уже на 56 сутки этот показатель возвращается к фоновым значениям.

Во второй опытной группе достоверные изменения уровня базофилов костного мозга также отмечается только на 42 день эксперимента. В этот период отмечается выраженное повышение количества базофилов в 2,04 раза, но на 56 сутки наблюдения их уровень снижается до фоновых значений.

В 3 группе повторная остеоперфорация способствует более выраженному росту уровня базофилов в костном мозге. Максимального значения они достигают на 35 сутки

опыта. В дальнейшем происходило незначительное снижение

Межгрупповые различия у животных 1 и 2 групп наблюдаются на 14, 21, 28 сутки. В отмеченные периоды преобладают показатели животных 1 группы (без рентгеновского облучения).

У собак 2 и 3 групп на 7 сутки отмечается рост показателей, более выраженный у собак 3 группы. На 14 сутки различия усиливаются. На 21 сутки различия в уровне базофилов исчезают и появляются только после повторной остеоперфорации. В это время у собак 3 группы наблюдается резкое увеличение количества базофилов в костном мозге, которое начинается на 28 сутки и достигает максимума на 35 сутки и достоверно превышает аналогичный показатель животных 2 группы. В последующие сроки межгрупповые различия становятся недостоверными.

2.6.4. Распределение эозинофилов костного мозга по степени созревания

Для эозинофилов костного мозга характерна высокая степень вариации показателей, поэтому на протяжении всего опыта наблюдаемые изменения этих клеток оказались статистически недостоверными.

Полученные нами данные показывают, что однократная лазерная остеоперфорация не оказывает достоверного воздействия на динамику содержания эозинофилов в костном мозге у собак. Однако выявлена тенденция к снижению количества эозинофилов костного мозга после рентгеновского облучения, а также после лазерной остеоперфорации, которая выражена сильнее у собак 2 и 3 опытных групп.

В 3 опытной группе нами отмечена тенденция к повышению количества эозинофилов через 7 суток после проведения повторной остеоперфорации, но эти изменения также не были достоверны.

2.6.5. Распределение моноцитов костного мозга по степени созревания

У животных 1 опытной группы под действием лазерной остеоперфорации в костном мозге происходило резкое кратковременное снижение количества моноцитов, которое на 7 сутки полностью компенсировалось. На 14 сутки произошло резкое кратковременное увеличение удельного веса изучаемых клеток, после которого на 21 сутки число моноцитов снизилось на 80%, не изменяясь до окончания опыта.

У животных 2 и 3 опытных групп рентгеновское облучение вызывало кратковременное снижение количества моноцитов. На 7 сутки происходило восстановление до 50-70% от фонового уровня. Проведение остеоперфорации приводило к повторному снижению количества моноцитов до 20-40% от фонового значения и оставалось на этом уровне до 56 суток опыта.

У животных 3 группы проведение повторной остеоперфорации вызывало на 35 сутки опыта выраженный кратковременный подъем количества моноцитов в 4,33 раза. На 56 сутки их количество повторно снижалось.

Межгрупповые различия у собак 1 и 2 опытных групп были выражены только на 14 сутки опыта, в момент повышения количества моноцитов у собак первой группы. В остальные периоды они были недостоверны.

Различия между собаками 1 и 3 групп наблюдались на 14 сутки. В этот период показатели собак 1 группы преобладали над показателями 3 группы. На 42 сутки наблюдалась обратная картина – показатели 3 группы преобладали над показателями 1 группы. Такое соотношение сохранялось и на 56 сутки.

Различия между 2 и 3 группами менее выражены. Достоверное отличие наблюдалось только на 42 сутки опыта, когда показатели 3 группы преобладали над показателями 2 группы. В остальные периоды времени динамика количества моноцитов костного мозга у животных 2 и 3 групп не имела достоверных различий.

2.6.6. Распределение недифференцированных клеток костного мозга по степени созревания

Наиболее резкие колебания количества недифференцированных клеток костного мозга наблюдаются у животных 1 опытной группы. На 7 сутки после лазерной остеоперфорации их количество снижается до 24,73% от фонового уровня. Начиная с 35 суток уровень недифференцированных клеток растет до конца опыта.

Все наблюдаемые изменения у собак второй опытной группы оказались статистически недостоверными. Однако нами отмечена тенденция к уменьшению количества недифференцированных клеток на 7 сутки после проведения рентгеновского облучения и через 14 суток после остеоперфорации (на 21 сутки опыта).

У собак третьей группы наблюдается тенденция к спаду данного показателя после рентгеновского облучения и в момент лазерной остеоперфорации. Начиная с 14 дня опыта их уровень растет и достигает максимума после повторной остеоперфорации, на 35 сутки опыта.

Различия между животными 1 и 2 групп недостоверны на протяжении всего периода наблюдения.

Между животными 1 и 3 групп различия более выражены. Рентгеновское облучение способствует резкому снижению содержания малодифференцированных клеток. На 7 сутки происходит уменьшение различий между этими группами за счет снижения количества недифференцированных клеток у собак 1 опытной группы. В последующие дни различия исчезают и появляются только после повторной остеоперфорации. При этом у животных 3 группы этот показатель в 3 раза выше, чем у собак первой группы. При последующем наблюдении межгрупповые различия недостоверны.

Различия между животными 2 и 3 опытной группы недостоверны.

2.6.7. Распределение молодых эритроидных клеток костного мозга по степени созревания

Количество базофильных эритробластов в костном мозге у собак первой опытной группы достоверно увеличивается начиная с 3 суток опыта. В дальнейшем происходит снижение содержания этих клеток в костном мозге и на 28 сутки их количество достигает фонового уровня.

Начиная с 4 недели после остеоперфорации, отмечается стимулирующий эффект

лазерной остеоперфорации – количество данных клеток резко повышается, достигая максимального значения на 42 сутки. Последующие изменения показывают снижение количества базофильных эритробластов в костном мозге до фонового уровня на 56 сутки.

Во второй и третьей опытных группах различия во все периоды наблюдения были высокодостоверны. Рентгеновское облучение и остеоперфорация стимулировали выброс изучаемых клеток из костного мозга в кровь. Особенно резкие изменения отмечались нами при рентгеновском облучении и двукратной остеоперфорации.

У собак 2 группы на фоне рентгеновского облучения на 3 сутки происходит количества изучаемых клеток на 38,55%. После лазерной остеоперфорации происходит еще более сильное повышение количества базофильных эритробластов, которое достигает максимума на 14 сутки. На 21 сутки количество изучаемых клеток снижалось до фонового уровня. Начиная с 42 суток происходило повторное увеличение количества данных клеток, которое продолжалось до 56 суток.

У собак третьей опытной группы рентгеновское облучение на 3 сутки также вызвало повышение количества базофильных эритробластов. Лазерная остеоперфорация вызывала более сильный и продолжительный эффект, который продолжался в течение 21 суток. Повторная остеоперфорация вызывала еще более резкое увеличение количества изучаемых клеток и на 28 сутки их количество было в 6,7 раза выше фона. В дальнейшем происходило снижение изучаемого показателя.

На 3 и 7 сутки у животных 1 группы количество базофильных эритробластов превышало данный показатель других групп на 49-84%. Различия наблюдаются и на 21 день. В этот период показатели животных 1 группы в 2,17 раза выше показателей 2 группы. На 28 сутки показатели животных 1 и 2 групп снижаются, а у животных 3 группы резко увеличиваются, поэтому различия между группами становятся достоверными. В этот период преобладают показатели 3 группы. Различия достигают 50% и более. На 35 сутки картина меняется на противоположную. Самый высокий показатель у животных 1 группы, а во 2 и 3 группах он минимален. Различия между 1 и 2 и 1 и 3 группами достоверны. Различия между 2 и 3 группами отсутствуют. На 42 сутки наблюдается рост показателей 1 группы и в меньшей степени – 2 группы. На 56 день во всех группах различия статистически недостоверны.

У животных первой опытной группы лазерная остеоперфорация в первые 7 суток эксперимента не вызывает появления статистически достоверных изменений молодых эритроидных клеток костного мозга. Начиная с 21 суток опыта, происходило увеличение их количества и на 35 сутки достигало максимального значения, достоверно превышая фоновый уровень на 61,22%. В дальнейшем происходило снижение количества изучаемых клеток и достигло фоновых значений на 56 сутки.

Во второй опытной группе статистически достоверных изменений количества молодых эритроидных клеток на протяжении всего периода наблюдения не происходило. Тем не менее, нами отмечена тенденция к снижению количества изучаемых клеток после проведения рентгеновского облучения, а также после лазерной остеоперфорации. Эти изменения не были достоверными.

В третьей опытной группе рентгеновское облучение вызывало достоверное сниже-

ние количества молодых эритроидных клеток на 44% на 7 сутки опыта. Проведение лазерной остеоперфорации вызывало достоверное повышение количества изучаемых клеток, которое достигало максимума на 28 сутки опыта и оставалось на этом уровне до 56 суток опыта.

Статистически достоверные межгрупповые различия наблюдаются только после 21 дня. При этом показатели животных первой группы в этот период времени выше показателей второй и третьей групп. Разница между показателями находится в пределах от 30 до 122 %.

Различия в содержании молодых эритроидных клеток между животными 1 и 2 групп появляются только на 21-35 сутки опыта. В это время преобладают показатели собак первой группы, превосходя показатели 2 группы в 1,5 раза. До 35 суток различия еще более усиливаются и достигают величин в 2,2 раза, а с 42 суток становятся недостоверными за счет снижения изучаемого показателя у собак 1 группы.

Различия между животными 1 и 3 опытных групп менее выражены и появляются только на 21 и 35 сутки. В это время преобладают показатели 1 группы (в 1,3 и 1,5 раза соответственно), а с 42 суток достоверные межгрупповые различия исчезают.

Между показателями второй и третьей групп различия достоверны на 28-35 сутки. В этот период показатели собак третьей группы превалируют над показателями второй группы.

Обобщая полученные данные можно сделать общее заключение, что при рентгеновском облучении происходит гибель малодифференцированных быстро делящихся клеток костного мозга. Однократная лазерная остеоперфорация ускоряет пролиферацию и выход в периферическую кровь нейтрофилов на поздних этапах их дифференцировки. Однако наибольшее влияние однократная остеоперфорация оказывает на красный росток костного мозга, вызывая значительное повышение количества молодых эритроидных клеток костного мозга. Повторная лазерная остеоперфорация в наибольшей степени вызывала увеличение количества малодифференцированных клеток и клеток-предшественников нейтрофилопоэза и ускоряла регенеративные возможности костного мозга. В то же время, проведение повторной лазерной остеоперфорации оказывало угнетающее воздействие на красный росток костного мозга.

В Ы В О Д Ы

1 Моделирование лучевой болезни с помощью рентгеновского облучения в дозе 300 R вызывает развитие острой лучевой болезни средней тяжести, которая клинически проявляется общим угнетением животных, повышением общей температуры тела, рвотой, диареей. Гематологически острая лучевая болезнь проявлялась начиная с 3 суток резким снижением содержания в периферической крови лейкоцитов.

2 Лазерная остеоперфорация эпифизов костей здоровых животных по предложенной схеме вызывает в периферической крови достоверное повышение содержания эритроцитов, с 3 по 21 сутки наблюдения. В дальнейшем их количество постепенно снижается и на 56 сутки достигает фонового значения.

Количество лейкоцитов в крови достоверно повышалось в течение 28 суток. При

последующем наблюдении происходило снижение данного показателя, однако на 56 сутки оставалось на 22,34% выше фонового уровня.

Концентрация гемоглобина в крови повышалась с 3 по 21 сутки в среднем на 7,5 % В дальнейшем происходило снижение этого показателя до фоновых значений на 56 сутки

3 Лазерная остеоперфорация у здоровых собак вызывает выраженный сдвиг кривой созревания нейтрофилов вправо (увеличение количества палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов), наблюдающийся в течение первых 7 суток, при этом удельный вес молодых форм нейтрофилов (промиелоцитов, миелоцитов, метамиелоцитов) остается без изменений На 14 сутки форма кривой распределения нейтрофилов по степени созревания восстанавливается

Изменение удельного веса моноцитов костного мозга носит волнообразный характер на 3 сутки после остеоперфорации, их количество снижается, на 7-14 сутки, повышается до фонового уровня и повторно снижается на 21 сутки, оставаясь на этом уровне до конца наблюдения

4 Однократная лазерная остеоперфорация эпифизов костей на фоне острой лучевой болезни средней тяжести вызывает максимальное повышение количества эритроцитов на 21-28 сутки наблюдения на 44,62%

Повышение концентрации в крови гемоглобина наблюдалось с 28 суток опыта и достигало максимума на 42 сутки, превысив фон на 28,82%

Количество лейкоцитов в крови начиная с 14-х суток опыта восстанавливалось до $6,58 \pm 0,70$, что составляет 82,66% от исходного уровня

5 В красном костном мозге на фоне лазерной остеоперфорации у собак, больных острой лучевой болезнью наблюдается кратковременное достоверное снижение молодых форм нейтрофилов После проведения лазерной остеоперфорации наблюдается увеличение количества зрелых форм нейтрофилов

Динамика изменения содержания моноцитов носит волнообразный характер

Количество базофилов костного мозга повышается на 42 сутки в 2,04 раза, на 56 сутки происходит снижение до фоновых значений

6 На фоне двукратной лазерной остеоперфорации на фоне острой лучевой болезни повышение содержания в периферической крови эритроцитов и гемоглобина существенно не отличалось от однократной

Количество лейкоцитов в крови на фоне двукратной лазерной остеоперфорации при острой лучевой болезни на 56 сутки полностью восстанавливалось до исходного уровня

7 В красном костном мозге на фоне двукратной лазерной остеоперфорации у собак, больных острой лучевой болезнью после проведения однократной лазерной остеоперфорации происходит сдвиг кривой созревания нейтрофилов вправо, а через 7 суток после проведения повторной остеоперфорации наблюдается увеличение количества молодых форм нейтрофилов (миелоцитов, метамиелоцитов)

Количество базофилов повышается, достигая максимума на 7 сутки (в 1,83 раза выше фона), на 35 сутки превышение фона составляет в 2,67 раза, оставаясь на этом уровне до конца опыта

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1 С целью стимуляции гемопоэза у собак при острой лучевой болезни рекомендуется под действием миорелаксантов, производить однократное нанесение остеоперфораций в костях поясов грудной и тазовой конечностей (лопатка, подвздошная и седалищные кости), эпифизов трубчатых костей грудной и тазовой конечностей (плечевая, локтевая, бедренная, большая и малая берцовые кости, пяточная) с двух сторон, и грудине в течение 2-3 секунд в 2-3 точках на каждый эпифиз и кость пояса конечности на расстоянии 1,0-1,5 см друг от друга с помощью инфракрасного диодного лазера ЛС-097 ИРЭ ПОЛЮС в импульсно-периодическом режиме 100×50, с длиной волны 970 нм, при мощности 25 Вт с формированием сквозных перфорационных отверстий в зоне эпифизов костей в перпендикулярных плоскостях

2 Результаты работы является теоретической и экспериментальной основой для внедрения данного метода стимуляции гемопоэза в ветеринарную практику

3 Основные положения работы могут быть использованы в учебном процессе кафедр хирургии, а также при написании учебных пособий и монографий

Список работ, опубликованных по теме диссертации

- 1 Стрижиков, В В Характеристика гематологических показателей у собак после рентгеновского облучения / В В Стрижиков // Труды международной научно-практической конференции, посвященной 75-летию УГАВМ «Актуальные проблемы ветеринарной медицины», Троицк УГАВМ, 2004, С 158-159
- 2 Молоканов, В А Стимуляция гемопоэза у животных методом лазерной остеоперфорации / В А Молоканов, В В Стрижиков // Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 75-летию УГАВМ «Актуальные проблемы биологии и ветеринарной медицины мелких домашних животных», Троицк УГАВМ, 2005, С 265-269
- 3 Пашнин, Д А Влияние лазерной остеоперфорации на биохимический статус собак / Д А Пашнин, В В Стрижиков, Р В Михайленко // Материалы IX научно-практической конференции, посвященной 75-летию УГАВМ «Перспективные направления научных исследований молодых ученых», Троицк УГАВМ, 2005, С 113-114
- 4 Стрижиков, В В Динамика гемопоэза, содержания общего белка и среднемoleкулярных пептидов в сыворотке крови на фоне лазерной остеоперфорации / В В Стрижиков, Д А Пашнин, Р В Михайленко // Материалы IX научно-практической конференции, посвященной 75-летию УГАВМ «Перспективные направления научных исследований молодых ученых», Троицк УГАВМ, 2005, С 142-143
- 5 Пашнин, Д А Влияние высокоинтенсивного лазерного излучения на динамику гемопоэза и перекисного окисления липидов / Д А Пашнин, В В Стрижиков, Р.В. Михайленко // Сборник материалов II Всероссийской конференции «Молодые ученые – сельскому хозяйству России», Москва ФГНУ «Росинформагротех», 2005
- 6 Молоканов, В А Способ стимуляции репаративного остеогенеза у животных и человека / В А Молоканов, В А Привалов, И В Крочек, Е П Циулина, А В Лаппа, В В Стрижиков и др // Официальный бюллетень «Изобретения Полезные модели» – 2005 – №19 – С 741

- 7 Молоканов, В А Способ стимуляции гемопоэза у животных / В.А Молоканов, В А Привалов, И В Крочек, В В Стрижиков и др // Официальный бюллетень «Изобретения Полезные модели» – 2006 – №36 – С 233

Технические решения

- 1 Пат 2255700 Российская Федерация, МПК А 61 В 18/22 Способ стимуляции репаративного остеогенеза у животных и человека / В А Молоканов, В А Привалов, И В Крочек, Е П Циулина, А В Лаппа, В В Стрижиков, И И Шумилин, заявитель и правообладатель Уральская государственная академия ветеринарной медицины - 2003120791/14; заявл 07 07 2003, опубл 10 07 2005, бюл № 19
- 2 Пат 2290231 Российская Федерация, МПК А61N 5/067, А61N 5/06, А61Р 7/00 Способ стимуляции гемопоэза у животных / В А Молоканов, В А Привалов, И В Крочек, В В Стрижиков, А В Лаппа, Д А Пашнин, заявитель и правообладатель Уральская государственная академия ветеринарной медицины - 2005114288/13, заявл 11 05 2005, опубл 27 12 2006, бюл 36

На правах рукописи

Стрижиков Виталий Викторович

**Лазерная остеоперфорация как способ стимуляции
гемопоэза при острой лучевой болезни у собак
(клинико-экспериментальные исследования)**

16 00 05 – ветеринарная хирургия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Сдано в набор 3 04 2007 Подписано в печать 4 04 2007
Формат 60 x 84 1/16 Усл печ л 1 0 Печать оперативная
Бумага офсетная Гарнитура «Times» Заказ № 567 Тираж 100 экз

Издательский центр УГАВМ,
лицензия ЛР №021252 от 31 октября 1997г
457100, г Троицк, Челябинская обл ул Гагарина, 13
Тел (35-163) 2-64-75

Отпечатано в издательском Центре УГАВМ