



На правах рукописи

Черевиченко

ЧЕРЕВИЧЕНКО ВИКТОРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**Клинико-морфологические и микробиологические
показатели животных с экспериментальным и
спонтанным остеомиелитом на фоне цитокиновой
иммунокоррекции**

16.00.02 – патология, онкология и морфология животных

АВТОРЕФЕРАТ

26 НОЯ 2009

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Саратов 2009

Работа выполнена на кафедре паразитологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова»

Научный руководитель - доктор ветеринарных наук, доцент
Анников Вячеслав Васильевич

Официальные оппоненты: - доктор медицинских наук, профессор
Белов Лев Георгиевич

- доктор ветеринарных наук, профессор
Ватников Юрий Анатольевич

Ведущая организация: ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана».


Защита состоится «18» декабря 2009 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д. 220.061.01 при ФГОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова» по адресу: 410005, РФ, г. Саратов, ул. Соколова, 335, тел. 8-(8452)-69-25-32.

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 410012, РФ, г. Саратов, Театральная пл., 1, ФГОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова», диссовет Д. 220.061.01

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова»

Автореферат разослан «14» ноября 2009 г. и размещен на сайте: www.sgau.ru

Ученый секретарь диссертационного совета,
к.б.н., доцент

 А.В. Егунова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Остеомиелит является тяжёлой патологией, развивающейся в результате экзогенных и эндогенных причин (Г.Н. Акжигитов и др., 1986; В.В. Григоровский, 2002; С.А. Тиходсев, А.А. Вишнеvский, 2006). В медицине морфофункциональной характеристике остеомиелита посвящено достаточное количество работ. Установлено, что в основе развития гнойно-некротического поражения кости лежит несостоятельность иммунитета. Доказано, что при осложнённом раневом процессе, в том числе и при остеомиелите, наблюдается глубокое угнетение функционального состояния иммунной системы, что выражается в снижении основных регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов, нарушении процессов дифференцировки клеток, недостаточности функции нейтрофильных фагоцитов (Г.М. Курманова и др., 2002). В результате уровень провоспалительных цитокинов начинает преобладать над уровнем противовоспалительных, что существенно тормозит процесс локализации воспаления.

В настоящее время проблема эффективного лечения больных остеомиелитом остаётся открытой как в медицине, так и в ветеринарии. Это обусловлено иммунными дисфункциями, особенностями морфологии костной ткани и ангиоархитектоники повреждённой остеомиелитом кости, которые при обычных способах введения химиотерапевтических средств затрудняют или делают невозможным проникновение препаратов в область дефекта, поэтому лечение часто оказывается неэффективным. Учитывая вышесприведённое, актуальным в настоящее время является разработка терапии остеомиелита, направленной не только на борьбу с инфекционным агентом, но и на коррекцию иммунологических нарушений, сопровождающих и способствующих хронизации болезни с учётом морфологических особенностей повреждённой остеомиелитом кости.

В связи с тем, что при остеомиелите животных остаётся неизвестным микробный состав очага поражения, состоятельность иммунитета, рентгенографические и морфологические особенности кости в острую и хроническую фазы болезни, для адекватного терапевтического лечения необходимо исследовать указанные показатели в модельном опыте с выяснением возможной экстраполя-

ции полученных данных на больных животных. В настоящее время имеется целый арсенал средств, воздействующих как на микроорганизм, так и на факторы доиммунного воспаления и иммунитета макроорганизма. Одним из иммунокорректоров, обладающего таким механизмом действия, является ронколейкин, хорошо зарекомендовавший себя при лечении иных гнойно-септических заболеваний (М.В. Островский, 2005).

Цель работы – определение клинико-морфологических показателей животных с экспериментальным и спонтанным остеомиелитом и их изменение на фоне цитокиновой иммунокоррекции.

Задачи исследования:

1. Разработать экспериментальную модель остеомиелита и на этой основе выявить структурно-функциональные критерии остеомиелитического очага.
2. Выявить особенности иммунного ответа, гематологические и рентгенографические показатели у экспериментальных животных, больных остеомиелитом и возможность их коррекции ронколейкином на фоне антибактериальной терапии.
3. Оценить степень минерализации костной ткани у больных остеомиелитом животных и особенности её восстановления в зависимости от разных способов терапии.
4. Изучить видовой состав микробов остеомиелитического очага у экспериментальных и спонтанно заболевших животных.
5. Определить адекватность полученной экспериментальной модели остеомиелита спонтанно заболевшим животным на основании микробиологических, иммунологических, клинико-гистологических, рентгенологических и гематологических показателей.
6. Разработать оптимальную схему лечения больных остеомиелитом экспериментальных животных с применением иммунокорректора ронколейкина и проверить её эффективность на спонтанно заболевших животных разных видов.

Научная новизна:

- Впервые выявлены гистологические особенности остеомиелитического очага, заключающиеся в разрушении периоста и эндоста, склерозе и полнокровии остеонов и сосудов костного мозга, наличии очагов дегенерации, диффузной клеточной инфильтрации лимфоцитами и сегментоядерными лейкоцитами грануляционной ткани.
- Получена модель экспериментального остеомиелита, адекватная таковой у спонтанно заболевших животных разных видов, сопровождающаяся развитием вторичного иммунодефицита.
- Доказано, что остеомиелит сопровождается резким снижением количества Т- и В-лимфоцитов.
- Впервые установлены закономерности изменения минерального состава костной ткани у животных в процессе развития остеомиелита, вызванного *S. aureus*, и особенности восстановления степени минерализации в зависимости от способов терапии.
- Впервые изучен видовой состав возбудителей раневого отделяемого при остеомиелите у спонтанно больных и экспериментальных животных, особенностью которого является ассоциация *Staphylococcus aureus* с *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, а также представителями грамотрицательной микрофлоры (*Escherichia coli* и *Proteus vulgaris*); доминирование монокультуры золотистого стафилококка над ассоциациями бактерий на всех стадиях болезни.
- Установлено позитивное действие цитокиновой иммунокоррекции на элиминацию возбудителя из очага поражения, а также на иммунологические, клинико-рентгенографические, гистологические и рентгенофотометрические показатели, а также процессы остеорепаляции и остеорегенерации.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные расширяют представление о клинико-морфологических изменениях, а также участии различных представителей условно-патогенных бактерий в развитии остеомиелитического процесса, открывая новые возможности для научно-обоснованного подхода к применению современных методов диагностики (программно-

цифрового способа оценки степени минерализации костной ткани, тест-систем АР1 20 АР1 50 СН) и способа терапии, предусматривающего коррекцию вторичного иммунодефицита.

Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии факультета ветеринарной медицины и биотехнологии ФГОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова» и на кафедре хирургии ФГОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет».

По итогам научной работы получено положительное решение о выдачи патента на изобретение «Способ лечения хронического остеомиелита у животных» от 1.07.2009 г., который предложен и внедрён в практику ветеринарной хирургии.

Материал диссертации используется в практической работе ветеринарных врачей г.г. Саратова, Энгельса, Омска.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Остеомиелит у животных гистологически характеризуется образованием очагов дегенерации, склерозом и полнокровием остеонов и сосудов костного мозга, умеренной диффузной клеточной инфильтрацией лимфоцитами и сегментоядерными лейкоцитами в грануляционной ткани.
2. Спонтанный и экспериментальный остеомиелит у животных развивается на фоне вторичного иммунодефицитного состояния, сопровождающегося уменьшением количества Т- и В-лимфоцитов.
3. Остеомиелит сопровождается снижением оптической плотности костной ткани, и как следствие. степени минерализации.
4. Этиологической особенностью остеомиелита у спонтанно заболевших животных является наличие в гнойном отделяемом условно-патогенных бактерий: *S. aureus*, *P. vulgaris*, а также *B. pumilus*. При экспериментально вызванном заболевании помимо *S. aureus* начинают выделяться ассоциации бактерий, в микробном спектре монокультура золотистого стафилококка доминирует над ассоциациями бактерий.

5. Комплексная антибактериальная терапия в сочетании с ронколейкином приводит к быстрому и полному исчезновению возбудителей из очага поражения и сопровождается нормализацией иммунного статуса, полноценной остеорегенерацией, что, в итоге, сокращает сроки лечения больных остеомиелитом животных и снижает риск возникновения рецидивов болезни.

Работа выполнена на кафедре паразитологии, эпизоотологии и ВСЭ, микробиологии, вирусологии и иммунологии факультета ветеринарной медицины ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ имени Н.И. Вавилова», морфологической лаборатории Саратовского НИИТО, в лаборатории молекулярной диагностики РосНИГЧИ «Микроб», в ветеринарном пункте СООО ЦРБ г. Саратова.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на: Международной научно-практической конференции «Вавиловские чтения» (Саратов, 2007, 2008гг.); Научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава и аспирантов ФГОУ ВПО «Саратовского ГАУ» по итогам научно-исследовательской и научно-методической работы (Саратов, 2008 г.); Всероссийской научно-практической конференции, посвящённой светлой памяти д.м.н., профессора Л. Ф. Зыкина «Актуальные вопросы ветеринарной патологии с/х животных и птиц» (Саратов, 2008 г.); Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы аграрной науки и образования» (Ульяновск, 2008 г.); V Всероссийской дистанционной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Современные проблемы устойчивого развития АПК РФ» (Ростов-на-Дону, 2008г.); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной патологии, физиологии и морфологии» (Саратов, 2008г.); Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди аспирантов и молодых учёных высших учебных заведений Министерства сельского хозяйства РФ (Казань, Москва, 2009 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 16 работ, из них одна статья в журнале, входящем в перечень ВАК РФ.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, практических предложений, списка использованных литературных источников и приложений. Материалы диссертации изложены на 153 страницах текста, иллюстрированы 10 таблицами и 16 рисунками. Список использованных литературных источников включает 311 наименований, в том числе 55 зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования явились 30 кроликов породы нидерландская красная в возрасте 4-х месяцев, с живой массой 3,5 – 4,0 кг и спонтанно заболевшие остеомиелитом животные; 2 собаки породы немецкая овчарка в возрасте 4 года и 7,5 лет, 1 кролик породы серый великан в возрасте 5 месяцев.

Материалами для исследования послужили: кровь; гнойное отделяемое свищевых каналов, сообщающихся с очагами поражения; рентгенограммы; большеберцовые кости.

Моделирование остеомиелита проводили по методике (В.И. Кошкин, В.И. Нагибин, 1970) в модификации авторов.

В работе использовали иммуномодулятор ронколейкин производства ООО «Биотех», представляющий собой генноинженерный аналог эндогенного цитокина, получаемого из рекомбинантного штамма дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae*, в генетический аппарат которых встроены ген человеческого интерлейкина-2, антибиотик цефазолин, изотонический (0,9 %-ный) раствор хлорида натрия, 3%-ный раствор перекиси водорода.

Определение гематологических и иммунологических показателей у экспериментальных животных осуществляли до начала моделирования и на 10, 65 и 75 сутки наблюдения, у спонтанно заболевших – при поступлении и в конце лечения. Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) устанавливали по методу Панченкова, количество гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов определяли на аппарате Нема-screen 7, лейкограмму подсчитывали однопольным методом, пользуясь лабораторным счётчиком СЛ-1 и микроскопом Биомед-5 с общим увеличением $\times 1000$ (Н.Т. Винников и др., 1999). Уровень Т- и В-лимфоцитов устанавливали

ливали методом спонтанного розеткообразования (А.В. Осипенко и др.,1993). Рентгенографическое исследование поражённых костей проводили на стационарном рентгенодиагностическом аппарате РУМ-20-М-1. Оптическую плотность костной ткани с целью изучения степени её минерализации осуществляли программно-цифровым методом с вычислением коэффициентов минерализации и окостенения (Т.С. Хапрова, В.В.Анников,2008). Морфологическое исследование костной ткани проводили общепринятыми в ветеринарии гистологическими методами: отбор, фиксация в формалине и подготовка материала (декальцинация, обработка спиртами возрастающей концентрации, пропитка в растворах целлоидина, уплотнение в парах хлороформа), изготовление блоков и гистопрепаратов с последующей их окраской гематоксилином-эозином по методу Беме-ра, исследование под микроскопом Биомед-5 с общим увеличением 40× и 100× (О.В. Волкова, 1982).

Отбор проб гнойного отделяемого и его исследование у экспериментальных животных проводили на 21, 45, 53, 65 и 75 сутки эксперимента, у спонтанно заболевших – перед лечением, а также перед окончанием курса терапии (5 – 10 сутки) по общепринятым в микробиологии методикам (Н.И. Розанов,1952). Видовую принадлежность выделенных бактерий устанавливали по определителю бактерий Берджи (Дж. Хоулт и др., 1997). В некоторых случаях использовали стандартизированные тест-системы API 50 CH и API 20 E с программным обеспечением идентификации Apiweb производства BioMerieux (Франция). Чувствительность к антибиотикам исследовали диско-диффузионным методом (С.Д. Воропаева, А.З. Смолянская, А.Б. Черномордик,1976).

Статистическую обработку полученных результатов проводили по общепринятой методике с использованием программы Statistica 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клинико-микробиологические и структурно-морфологические изменения у животных в условиях экспериментального моделирования остеомиелита

В первые сутки развития остеомиелита (21-е сутки от начала эксперимента) регистрировали резкий подъём температуры тела, ухудшение общего со-

стояния, образование очага воспаления, увеличение регионарных лимфатических узлов, острую болезненностью поражённой конечности. После образования свищевого канала и его вскрытия, сопровождающегося выделением скопившегося гнойного экссудата, наблюдали кратковременное улучшение общего состояния животных. На 45-е сутки экспериментального моделирования отмечали симптомы интоксикации, вызванные продуктами распада тканей и метаболитами возбудителей: прогрессирующее истощение и апатия, бледность слизистых оболочек и кожного покрова.

При проведении общего анализа крови регистрировали увеличение скорости оседания эритроцитов (до 3,8 мм/ч), сгущение крови, появление в крови юных форм лейкоцитов, увеличение количества базофилов (до 2,6%), сегментоядерных (до 46,0%) и палочкоядерных (до 6,4%). Возрастал индекс сдвига лейкоцитов и лейкоинтоксикационный индекс, что свидетельствовало о нарастающей в организме интоксикации. В ходе иммунологического обследования экспериментальных животных нами было выявлено стойкое снижение уровня Т-лимфоцитов (до 26,2%) и дисбаланс В-лимфоцитов (уменьшение в 1,6 раза в первой группе, увеличение в 1,6 раза во второй и в 2,4 раза - в третьей).

На 21-е сутки экспериментального моделирования остеомиелита в гнойном отделяемом свищей в 34% выделяли *S. aureus*, в 27% обнаруживали *P. vulgaris*, который был в составе ассоциаций с *B. pumilus*, *B. subtilis* и *S. aureus*, в 20% - *B. pumilus* и в 13% - *B. subtilis*. Реже всего встречались *E. coli* (6%). Монокультура *S. aureus* составила 55,6%, а ассоциации микроорганизмов 44,4%. Ассоциации, состоящие из трёх видов микроорганизмов (*P. vulgaris*, *B. subtilis*, *B. pumilus*), были в 33,3%, а из четырёх видов (*S. aureus*, *P. vulgaris*, *B. subtilis*, *B. pumilus*) - в 11,1%. Выделенные штаммы микроорганизмов были биохимически активными: обладали выраженными гемолитическими, протсолитическими, сахаролитическими свойствами и факторами патогенности. Все выделенные штаммы золотистого стафилококка были чувствительными к цефазолину (диаметр зоны задержки роста - 21,7 мм), ципрофлоксацину (20,8 мм), рифампицину (19,6 мм) и доксициклину (19,5 мм). Высокая антибиотикочувствительность протеев наблюдалась в отношении цефазолина (23,8 мм), доксициклина (21,1

мм), амоксицилина (20,3 мм), ципрофлоксацина (20,1 мм). Кишечные палочки и бациллы оказались чувствительными почти ко всем испытуемым антибиотикам, за исключением линкомицина. К 45-м суткам экспериментального остеомиелита *S.aureus* выделялся уже в 81% случаев, *P.vulgaris* – в 13%. На долю *V.pumilus* пришлось 6%. Другие представители микрофлоры отсутствовали. Монокультура составила 78,3%, а ассоциированная микрофлора – 21,7%. Монокультуру представлял только золотистый стафилококк, а ассоциированную микрофлору – золотистый стафилококк, бациллы и протеи. Все штаммы сохраняли, а некоторые даже усиливали биохимическую активность и факторы патогенности, становились резистентными ко многим классам антибиотиков, что проявлялось в уменьшении размера зоны задержки роста вокруг дисков. Учитывая максимальную чувствительность микрофлоры остеомиелитического очага, в качестве антимикробного препарата мы выбрали цефазолин.

Рентгенографически регистрировали появление периостальных наслоений, очагов просветления в месте введения патогенного агента, ослабление чёткости рисунка кости, экзостозы и зоны расслоения, наличие дегенеративной полости округлой формы с нечёткими контурами в метаэпифизе большеберцовой кости. На 45 сутки экспериментального моделирования макроскопически отмечали в метаэпифизе правой большой берцовой кости перфорационное отверстие 3 мм в диаметре, по окружности отграниченное грануляционной тканью. Вблизи перфорационного отверстия поперечник кости был увеличен, отмечали деструктивные изменения надкостницы – множественные костные напластования. При этом надкостница была матовой и имела желтовато-розовый оттенок. При вскрытии костномозгового канала обнаруживали некротические массы, гной, мелкие секвестры разрушенной костной ткани (эндоста и губчатого вещества). Микроскопически отмечали остеоны различного диаметра, некоторые из них были полнокровными и умеренно склерозированными, очаги разрушения костной ткани (некроза), в грануляционной ткани – умеренная диффузная клеточная инфильтрация, представленная лимфоцитами и сегментоядерными лейкоцитами. Костный мозг был представлен жёлтым костным мозгом с полнокровными, склерозированными сосудами. Гистологически отмечали полнокровные, уме-

ренно склерозированные остеоны различного диаметра, очаги разрушения костной ткани, в грануляционной ткани – умеренную диффузную клеточную инфильтрацию, представленную лимфоцитами и сегментоядерными лейкоцитами. полнокровие и склероз сосудов в жёлтом костном мозге.

С учётом полученных результатов мы разработали схему лечения больных остеомиелитом экспериментальных животных, включающую введение кроликам первой опытной группы ронколейкина подкожно в дозе 20 тыс. МЕ на кг живого веса на 1, 2, 3 и 6 сутки болезни в сочетании с внутримышечным введением антибиотика цефазолина в дозе 0,05 г на кг живой массы 2 раза в сутки в течение 7 суток. Кроликам второй группы инъецировали только антибиотик цефазолин по схеме, указанной выше. Кроликам третьей группы (контроль) вводили физиологический раствор в равном суммарном объёме. Всем экспериментальным животным проводили ежедневную санацию поражённой области 3%-ным раствором перекиси водорода.

Динамика клинико-микробиологических, иммунологических и структурно-морфологических показателей у экспериментальных животных на фоне антибиотикотерапии и комплексной цитокиновой иммунокоррекции

Проведённый курс сочетанной цитокиновой терапии позволил добиться быстрой нормализации клинических и гематологических показателей. В то время как у животных, которых лечили одним антибиотиком, это происходило в более поздние сроки. Общее состояние и картина крови животных контрольной группы свидетельствовала о наличии хронического воспалительного процесса.

Введение ронколейкина больным остеомиелитом животным первой группы позволило добиться в относительно короткие сроки стойкой нормализации уровня иммунокомпетентных клеток: увеличение количества Т-лимфоцитов до 47,7%, В-лимфоцитов – до 10,2%.

На 45 сутки после окончания комплексного лечения на рентгенограммах отсутствовали признаки воспаления костной ткани, восстановился её рисунок, деструктивная полость заполнилась молодой грануляционной тканью. У животных второй опытной группы рентгенологически отмечали слабо развивающую-

ся грануляционную ткань, нечёткость рисунка кости и границ кортикального слоя. У животных контрольной группы наблюдали усиление деструкции кости. Появлялись множественные мелкие очаги разрушения костной ткани в эпифизах большеберцовых костей, увеличение площади поражения.

На 3 сутки от начала лечения в патологическом материале животных, комплексно лечённых ронколейкином в сочетании с цефазолином, обнаруживали те же виды микроорганизмов, что и на 45-сутки эксперимента. Изучение биохимических и биологических свойств возбудителей показало, что все представители образовывали незначительную зону гемолиза на кровяном агаре, золотистый стафилококк не выделял лецитовителлазу и плазмокоагулазу, все штаммы слабо разжижали питательную желатину. У животных, которым инъецировали один антибиотик, изменилось только процентное соотношение возбудителей остеомиелита: повысился процент *S.aureus* (98%), снизился удельный вес *B.pumilus* (2%), отсутствовал *P.vulgaris*. Возбудители оставались биохимически активными и сохраняли патогенные свойства. Микробный состав возбудителей животных контрольной группы был идентичен микробному составу, наблюдаемому у экспериментально больных остеомиелитом животных на 45 сутки опыта. На 6 сутки с момента начала терапевтических мероприятий у животных, которым проводили комплексную цитокиновую терапию, произошло в ряде случаев заращение свищевых каналов. У некоторых особей при наличии отделяемого из свищевых каналов возбудители не высевались. У трёх кроликов из группы, подвергавшихся только антибиотикотерапии, выделяли не патогенные *S. aureus*. После курса лечения (65-е сутки наблюдения) у животных первой и второй экспериментальных групп микрофлора из очагов остеомиелита не высевалась. У кроликов группы контроля возрос удельный вес золотистого стафилококка (82%), и вульгарного протeya (14%), что указывало на прогрессирование гнилостных процессов в очаге остеомиелита. При этом, монокультура составила 85,7%, ассоциации – 14,3%. Штаммы, выделенные от животных группы контроля, сохраняли высокую биохимическую активность, при культивировании на кровяном агаре образовывали обширную зону β -гемолиза. Золотистый стафилококк оставался коагулозопозитивным и обладал лецитовителлазной активно-

стью. К 75-м суткам эксперимента у животных, которым этиотропная терапия не проводилась (контрольная группа), микрофлора очага поражения была представлена монокультурой золотистого стафилококка, который сохранил высокую биохимическую активность и усилил антибиотикорезистентные свойства.

После проведённого курса комплексной терапии морфологические изменения в большеберцовых костях кроликов первой группы были следующими: восстановился блеск надкостницы, местами она была покрыта волокнами фибрина, сосуды слегка гиперемированны, микроскопически костная пластинка была компактного строения и имела участки обызвествления. Межбалочные пространства содержали фиброретикулярную ткань. Встречались очаги разрастания костной ткани, вокруг которых располагались грануляции со слабой клеточной воспалительной реакцией. Костный мозг полнокровный с элементами красного ростка. Периост частично сохрaнён.

У животных второй группы макроскопически периост поражённых большеберцовых костей был тусклым, имел шероховатую поверхность вблизи перфорационного отверстия, отмечали выраженную инъекцию сосудов надкостницы. В гистопрепаратах отмечали костную пластинку, имеющую компактное строение, неактивный периост, остеоны различного диаметра. Некоторые из остеонов полнокровны и слегка склерозированы. Отмечались небольшие очаги разрушения костной ткани. В грануляционной ткани – изменённая диффузная клеточная инфильтрация лимфоцитами, плазмócитами, сегментоядерными лейкоцитами. Эндост был местами с умеренной пролиферацией остеобластов. Костный мозг был представлен, в основном, жёлтым, местами с полнокровными склерозированными сосудами.

Макроскопически у кроликов контрольной группы, которым терапия не проводилась, регистрировали тусклую надкостницу с деструктивными изменениями в виде параоссальных наслоений, выраженную гиперемию сосудов, большое количество некротических масс в очаге поражения. В гистосреззах большеберцовых костей контрольной группы кроликов отмечали фрагменты компактной костной ткани, переходящие в трабекулы подлежащей губчатой кости. Единичные трабекулы были утолщены, умеренно полнокровны. В меж-

балочных пространствах отмечали наличие фиброретикулярной ткани. Жёлтый костный мозг местами обеднён элементами красного костного мозга. Фрагменты грануляционной ткани с клеточной инфильтрацией, представленной плазмócитами, сегментоядерными лейкоцитами, единичными гистиоцитами. Периост и эндост не прослеживались.

Таким образом, гистологические изменения позволяют заключить, что процесс регенерации повреждённой остеомиелитом кости у животных первой группы происходил по типу вторичного сращения. Об этом свидетельствовало наличие грануляционной ткани в межбалочных пространствах и наличие очагов обызвествления в костной пластинке. У животных второй экспериментальной группы механизм заживления был аналогичен таковому у животных первой группы, но занимал более продолжительный период времени. У животных первой группы преобладала первая стадия репаративного процесса – ближайший катаболический период, сопровождающаяся прогрессированием некротических процессов в костной ткани.

Оценка степени минерализации костной ткани больных остеомиелитом экспериментальных животных программно-цифровым методом до и после терапии

На 21-е сутки наблюдения программно-цифровой метод обработки рентгенограмм позволил выявить снижение оптической плотности костной ткани во всех исследуемых зонах поражённых костей у всех экспериментальных животных, и особенно в области кортикального слоя (в 1,9 раза), по сравнению с оптической плотностью аналогичных зон костей животных интактных животных. Кроме того, была выявлена тенденция к стойкому снижению содержания минеральных солей в поражённой кости в стадии хронизации процесса. Уже к 45-м суткам эксперимента наблюдалось стойкое снижение содержания минеральных солей в поражённых костях. Так, оптическая плотность в зоне поражения снизилась в первой группе – в 1,5 раза, во второй опытной группе – в 1,4, в контрольной группе – в 1,3 раза. В губчатом веществе также наблюдалось снижение в среднем в 1,4 раза по сравнению со значением здоровых животных. У

кроликов первой опытной группы отмечалось незначительное снижение этого показателя в области зоны поражения и увеличение в кортикальном слое и губчатом веществе. Коэффициент окостенения составил 1,66. В большеберцовых костях экспериментальных животных второй группы коэффициент минерализации снижался не только в зоне поражения, но и в кортикальном слое. В связи с этим, коэффициент окостенения уменьшился на 0,19 единицы. В третьей группе регистрировался подъём значений обоих коэффициентов в 2 раза. Через 45 суток после курса терапии оптическая плотность большеберцовых костей животных, которым вводили цефзолин в сочетании с ронколейкином, во всех исследуемых нами зонах и коэффициенты окостенения возросли в 2 раза, что свидетельствовало об активизации регенеративных процессов. Положительная динамика прослеживалась среди животных, в терапии которых применяли только антибиотик цефазолин. У животных контрольной группы продолжалось снижение коэффициентов минерализации и окостенения.

Оценка комплексной цитокиновой терапии у спонтанно заболевших остеомиелитом животных

Апробация разработанного в эксперименте метода лечения проведена на 3 спонтанно заболевших животных, в том числе у 1 животного (кролик) остеомиелит развился после операции, у 2 собак – после ушибов.

Диагноз остеомиелита подтверждали комплексным клинико-рентгенологическим обследованием. Рентгенографические особенности поражённых костей, а также видовой состав микрофлоры был близок с выделенной у кроликов в эксперименте. В гнойном отделяемом свищевых каналов обнаруживали микроорганизмы родов стафилококк, бациллы и протей, сходных со штаммами бактерий, обнаруженных у экспериментально больных животных, по биохимическим, биологическим свойствам и чувствительности к антибиотикам. Учитывая чувствительность микрофлоры очага к цефазолину и снижение количества иммунокомпетентных клеток (Т- и В-лимфоцитов), была применена разработанная нами и апробированная в эксперименте схема терапии, предусматривающая введение цитокинового иммунокорректора ронколейкина в комплек-

се с антибиотиком. К 5 – 10 суткам комплексной терапии наблюдали улучшение общего состояния животных, нормализацию температуры тела, появление аппетита. Уменьшение в размерах воспалительного отёка. Незначительное количество отделяемого экссудата из раны. Бактериологический анализ проб раневого отделяемого возбудителей не выявил. Через 20 суток после окончания терапии анатомо-функциональный результат у всех животных был положительным. Это проявлялось в исчезновении внешних признаков воспаления, восстановлении функциональной способности поражённой конечности, а также чёткости рисунка кости и границ кортикального слоя, заполнение грануляционной тканью деструктивной полости, выявляемых на рентгенограммах.

Таким образом, проведённые исследования позволили установить морфологические особенности очагов остеомиелита, состоятельность иммунитета, значение различных представителей условно-патогенных бактерий в развитии остеомиелита у животных, открыть перспективы использования программно-цифрового способа оценки степени минерализации костной ткани для ранней диагностики остеомиелитического процесса, а также научно обосновать эффективность терапии, направленной не только на уничтожение возбудителей болезни в очаге поражения, но и на коррекцию вторичного иммунодефицита.

ВЫВОДЫ

1. Остеомиелитический очаг у животных гистологически характеризуется умеренным склерозом остеонов, наличием очагов разрушения костной ткани, полнокровием и склерозом сосудов жёлтого костного мозга, умеренной диффузной клеточной инфильтрацией в грануляционной ткани.
2. Остеомиелит у животных сопровождается стойким снижением количества Т- и В-лимфоцитов, увеличением СОЭ, гематокрита, появлением в крови юных форм лейкоцитов, увеличением количества базофилов, сегментоядерных и палочкоядерных лейкоцитов, наличием дегенеративной полости с нечёткими контурами, периостальными наслоениями, ослаблением чёткости рисунка кости, экзостозами и зонами расслоения в области надкостницы.

3. Рентгенофотометрически остеомиелит характеризуется снижением оптической плотности костной ткани во всех структурных зонах поражённой кости: в кортикальном слое кости – в 1.3 – 1.5 раза, в губчатом веществе – в 1,4 раза и зоне поражения – в 2 раза.

4. Из раневого отделяемого остеомиелитического очага у спонтанно заболевших остеомиелитом животных выделены условно-патогенные микроорганизмы видов: *S.aureus*, *P.vulgaris*, *B.pumilus*, обладающие факторами патогенности и повышенной устойчивостью к антибиотикам. Присутствие в гнойном отделяемом бацилл является отличительной особенностью остеомиелита у животных. При экспериментальном остеомиелите наряду с *S. aureus* начинают выделяться ассоциации бактерий. При хронизации процесса возрастает частота выделения монокультуры *S.aureus*.

5. Экспериментальная модель остеомиелита, полученная на взрослых кроликах, адекватна спонтанному заболеванию у животных по микробиологическим, иммунологическим, клиническим, рентгенологическим, гистологическим и гематологическим показателям.

6. Разработанная и апробированная схема лечения больных остеомиелитом экспериментальных животных, предусматривающая применение иммунокорректора ронколейкина в комплексе с антибиотиком, эффективна при лечении спонтанно заболевших животных разных видов. Об этом свидетельствовало заживление раны, нормализация иммунологических и рентгенологических показателей в более ранние сроки (5 – 10 сутки).

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Раннюю диагностику остеомиелита можно проводить, оценивая рентгенограммы поражённых костей программно-цифровым методом с последующим определением оптической плотности, коэффициентов окостенения и минерализации костной ткани.

2. Микробиологическое изучение патологического материала от больных остеомиелитом животных целесообразно проводить в динамике с целью оценки эффективности проводимой терапии.

3. При лечении больных остеомиелитом животных для коррекции вторичного иммунодефицита следует включать в состав комплексной терапии препарат «Ронколейкин», который следует вводить в дозе 20 тыс. МЕ/ кг живого веса на 1, 2, 3 и 6 сутки лечения в сочетании с антибиотиком, к которому выделенная из очага поражения микрофлора будет проявлять наибольшую чувствительность (получено положительное решение о выдаче патента на изобретение «Способ лечения хронического остеомиелита у животных»).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Анников, В.В. Клинико-морфологическая характеристика экспериментально-го остеомиелита животных / В.В. Анников, В.А. Черевиченко // Вавиловские чтения – 2007: Материалы конференции, посвященной 120-й годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова, 26 – 30 ноября 2007, секция «Ветеринария и биотехнология». – Саратов: Научная книга, 2007. – Ч.1. – С. 293 – 294.
2. Анников, В.В. Морфология крови при остеомиелите / В.В. Анников, В.А. Черевиченко // Ветеринарная медицина домашних животных: сборник статей. – Казань: Печатный двор, 2007. – Выпуск 4. – С. 30 – 32.
3. Черевиченко, В.А. Микробный профиль при экспериментальном остеомиелите / В.А. Черевиченко, В.В. Анников, Л.С. Назарова // Ветеринарная медицина. Современные проблемы и перспективы развития: Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции 2008. – Саратов: Научная книга, 2008. – С. 429 – 431.
4. Черевиченко, В.А. Характеристика патогенных свойств возбудителей остеомиелита у животных в условиях эксперимента / В.А. Черевиченко, Л.С. Назарова, В.В. Анников // Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной памяти профессора кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГОУ ВПО Саратовского ГАУ им. Н.И. Вавилова, профессора, доктора медицинских наук, Зыкина Леонида Федоровича, 24 - 25 апреля 2008, секция «Актуальные проблемы ветеринарной патологии сельскохозяйственных животных и птиц». – Саратов: Научная книга, 2008. – С. 38 – 40.

5. Черевиченко, В.А. Рентгенологическое и морфологическое обоснование иммуноориентированной дрожжевым β -галактозидазой терапией, больных остеомиелитом животных / В.А. Черевиченко, В.В. Анников // *Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы аграрной науки и образования», посвящённой 65-летию Ульяновской ГСХА.* – Ульяновск, 2008. – Т. 3. – С. 149 – 150.
6. Черевиченко, В.А. Морфологическое обоснование терапевтической эффективности Ронколейкина при экспериментальном остеомиелите животных / В.А. Черевиченко, В.В. Анников // *Ветеринарная клиника.* – 2008. – № 6. – С. 9 – 10.
7. Черевиченко, В.А. Характер бактериальной контаминации при экспериментальном остеомиелите животных / В.А. Черевиченко, В.В. Анников, Л.С. Назарова // *Современные проблемы устойчивого развития агропромышленного комплекса России: Материалы пятой Всероссийской дистанционной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных.* – пос. Персиановский, ДонГАУ, 2008. – С. 83 – 84.
8. Рентгенологические и морфологические изменения костной ткани как критерии оценки эффективности применения ронколейкина в лечении животных с костно-гнойной патологией / В.В. Анников, В.А. Черевиченко, И.В. Родионов, К.Г. Бутовский // *Materiały IV międzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji «Naukowy potencjał świata – 2008»* Тум 8. *Medycyna. Nauk biologicznych. Weterynaria. Przemysł.* 2008. – С. 85 – 87.
9. Черевиченко, В.А. Клинико-морфологическое и микробиологическое обоснование использования ронколейкина для иммуностимуляции при комплексной терапии хронического остеомиелита у животных / В.А. Черевиченко, Л.С. Назарова // *Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н. И. Вавилова.* – 2008. – № 8. – С. 40 – 42.
10. Черевиченко, В.А. К вопросу об информативности рентгенологического обследования при лечении больных остеомиелитом животных / В.А. Черевиченко, В.В. Анников // *Ветеринарная медицина домашних животных: сборник статей.* – Казань: Печатный двор, 2008. – Выпуск 5. – С. 198 – 200.

11. Черевиченко, В.А. Состояние минерализации костной ткани при остеомиелите животных / В.А. Черевиченко, В.В. Анников, И.В. Родионов // Ветеринарная медицина домашних животных: сборник статей. – Казань: Печатный двор, 2008. – Вып. 5. – С. 200 – 202.
12. Черевиченко, В.А. Иммунологическое обоснование эффективности применения ронколейкина в лечении хронического остеомиелита животных / В.А. Черевиченко, В.В. Анников, И.В. Родионов // «Постигането на висшето образование», Материали за 4-а международна научна практична конференция, – 2008. Лекарство. Химия и химически технологии. Екология. Ветеринарна наука. Селско стопанство. София. «Бял ГРАД-БГ» ООД. – Т. 10. – С. 65 – 68.
13. Применение прораммно-цифрового способа оценки состояния минерализации костной ткани животных, больных остеомиелитом, на фоне цитокиновой иммунокоррекции и в её отсутствие / В.А. Черевиченко, В.В. Анников, Т.С. Хапрова, И.В. Родионов // «Настоящи изследвания», Материали за 5-а международна научна практична конференция. – 2009. Лекарство. Ветеринарна наука. Екология. София. «Бял ГРАД-БГ» ООД. – Т.11. – С. 44 – 47.
14. Черевиченко, В.А. Обоснование применения иммунокорректирующей терапии у мелких непродуктивных животных при костно-гноной патологии / В.А. Черевиченко // Актуальные проблемы ветеринарной патологии, физиологии, биотехнологии, селекции животных. Современные технологии переработки сельскохозяйственной продукции: Материалы всероссийской научно-практической конференции 2 – 6 февраля 2009 года, посвящённой 90-летию факультета (института) ветеринарной медицины. – Саратов: Издательский центр «Наука», 2009. – С. 136 – 139.
15. Черевиченко, В.А. Идентификация грампозитивных палочек рода *Bacillus* с использованием универсальных стандартизированных тест-систем / В.А. Черевиченко, В.В. Анников, Л.С. Назарова // Актуальные проблемы ветеринарной патологии, физиологии, биотехнологии, селекции животных. Современные технологии переработки сельскохозяйственной продукции: Материалы всероссийской научно-практической конференции 2 – 6 февраля 2009 года, посвящённой

90-летию факультета (института) ветеринарной медицины. – Саратов: Издательский центр «Наука», 2009. – С. 142 – 146.

16. Черевиченко, В.А. Морфологические изменения в костной ткани при лечении больных хроническим остеомиелитом животных / В.А. Черевиченко, В.В. Анников // Труды XVII Московского Международного ветеринарного конгресса. Москва, 2009. – С.123 – 124.

Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная. Подписано в печать 13.11.2009

Гарнитура Times. Печать Riso.

Усл. печ. л. 1,00. Тираж 100 экз. Заказ 0317

Отпечатано с готового оригинал-макета в типографии ИП «Экспресс тиражирование»
410005, Саратов, Пугачёвская, 161, офис 320 ☎ 27-26-93