

УДК 617-089

## ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ И ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ГНОЙНОГО ОСТЕОМИЕЛИТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛОКАЛЬНЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ НОСИТЕЛЕЙ

Дзюба Г.Г., Ерофеев С.А., Одарченко Д.И., Щербakov Д.В.

ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия, Омск, e-mail: germanort@mail.ru

Исследование выполнено на 36 экспериментальных животных – кроликах. В основной группе оперативное лечение заключалось в сберегательной резекции остеомиелитического очага и установке армирующего локального продленного антибактериального носителя на основе полиметилметакрилата в полученную в результате резекции полость, в группе сравнения – радикальной резекции участка пораженной кости и прилежащих мягкотканых структур. В ходе эксперимента оценивались антимикробная эффективность имплантов, репаративные процессы, состояние неспецифической резистентности и функциональной активности иммунокомпетентных клеток. Полученные данные свидетельствуют о высоких saniрующих свойствах локальных антибактериальных имплантов, отсутствии депрессивного воздействия на общие и локальные механизмы иммунной защиты. При использовании локального антибактериального носителя в комплексе хирургического лечения остеомиелита отмечается более интенсивное подавление инфекционного процесса в костной ране, чем при традиционном способе лечения, что подтверждается динамикой клинических, гематологических и бактериологических показателей.

**Ключевые слова:** остеомиелит, длинные трубчатые кости, антибактериальный носитель, репаративная регенерация, иммунологический статус

## DYNAMICS OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND IMMUNE STATUS AT TREATMENT OF PURULENT OSTEOMYELITIS USING LOCAL MEDIA ANTIBACTERIAL

Dzuba G.G., Erofeev S.A., Odarchenko D.I., Sherbakov D.V.

Omsk State Medical Academy, Omsk, e-mail: germanort@mail.ru

The study was performed on 36 experimental animals – rabbits. The study group consisted of surgical treatment of osteomyelitis in the savings resection hearth and install reinforcing local prolonged antibacterial media based on polymethyl methacrylate resulting resection cavity in the comparison group – a radical resection of the affected bone area and the surrounding soft tissue structures. During the experiment evaluated the antimicrobial efficacy implants reparative processes nonspecific resistance state and functional activity of immune cells. The data indicate high local antimicrobial sanitizing properties of implants, the absence of a depressive effect on the general and local immune defense mechanisms. When using a local antibiotic carrier in the complex surgical treatment of osteomyelitis is celebrated more intense suppression of infection in bone wound than the traditional method of treatment, as evidenced by the dynamics of clinical, haematological and bacteriological parameters.

**Keywords:** osteomyelitis, long bones, antibacterial media, reparative regeneration, immune status

Лечение хронического остеомиелита длинных трубчатых костей является одной из важнейших задач ортопедии в связи с тем, что неуклонно растет количество тяжелых открытых травм, а также расширяются показания к оперативным методам лечения переломов [1, 3]. Классической методикой лечения остеомиелитического процесса является радикальная хирургическая обработка патологического очага с последующей длительной системной антимикробной терапией [6, 4]. Благодаря разработкам биodeградируемых носителей появилась возможность применять антимикробную терапию локально, что, несомненно, ускоряет процесс санации кости и снижает количество рецидивов [2, 11, 12, 13]. Однако такая методика требует последующего оперативного замещения пострезекционного дефекта, кроме того, сроки, способ и материалы для его реализации являются до настоящего времени во многом нерешенной

проблемой современной гнойной остеологии [5, 7, 9, 10].

**Цель исследования:** изучить эффективность воздействия локальных антибактериальных цементных носителей на подавление костной инфекции и комплекс общих и местных иммунных реакций при их применении в эксперименте.

### Материалы и методы исследования

Эксперимент выполнен на кроликах в количестве 36 голов, подобранных по принципу подобия: возраст 6 месяцев, вес 3 кг. Все экспериментальные животные были разделены на 2 группы: контрольную и основную по 18 животных в каждой. После получения модели остеомиелита выполнялось оперативное лечение, которое заключалось в краевой или сегментарной резекции кости в зависимости от степени распространенности очага остеомиелитической деструкции [4]. Полученный пострезекционный дефект в контрольной группе замещался мышечным лоскутом или гемопломбой. В основной группе в полученный пострезекционный дефект устанавливался

антибактериальный носитель на основе полиметилметакрилата с добавлением антибиотиков в соответствии с антибиотикограммой.

Динамику репаративных процессов в костной ране у животных обеих групп оценивали по клиническим, гематологическим показателям, изучая при этом изменения уровня маркеров остеобластов, таких как щелочная фосфатаза. Помимо изучения маркеров остеобластов изучали также показатели минерального обмена – содержание общего кальция и неорганического фосфора в периферической крови экспериментальных животных. Эффективность антимикробного воздействия на костную рану оценивали при помощи подсчета количественного содержания микробных культур в посевах раневого отделяемого.

Оценка состояния неспецифической резистентности проводилась по реакции фагоцитоза со стафилококком, с определением фагоцитарного числа и фагоцитарного индекса. Для определения функциональной активности иммунокомпетентных клеток, а также получения информации о тяжести воспалительного процесса и его переходе на системный уровень изучали содержание в крови провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (IL-2, IL-4, фактор некроза опухоли). В опытной группе анализ содержания цитокинов производился на 0, 7, 14, 30, 60 и 120 сутки с момента оперативного лечения.

Статистическая обработка данных включала подсчет средних арифметических величин (X), стандартных ошибок средних арифметических (m) и стандартного отклонения. Для проверки значимости гипотезы об отсутствии различий между исследуемыми группами был проведен однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Уровень значимости был принят на уровне  $p < 0,01$ . Расчеты были проведены с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0.

### Результаты исследования и их обсуждение

У всех животных в первые 7 суток после выполнения оперативного вмешательства наблюдали яркие признаки гнойного воспалительного процесса, который характеризовался гипертермией до  $39,5^{\circ}\text{C}$ , выраженным отеком мягких тканей в области

перелома, появлением раневого экссудата. Кролики при движении хромали и щадили больную конечность. К 14-м суткам после операции в основной группе явления воспаления купировались, нормализовалась температура тела, частично восстановилась функция оперированной конечности, заживление ран в 94,4% (17 животных). Происходило первичным натяжением. В контрольной группе подобная динамика наблюдалась к 28–50 суткам после операции, при этом заживление ран происходило преимущественно вторичным натяжением (66,6%) (12 животных). У 11 животных (61,1%) отмечались рецидивы гнойного процесса, приведшие, несмотря на активную антибактериальную терапию, к патологическим переломам в 27,7% (5 животных) и к летальности, составившей 16,7% (3 животных).

Локальная картина подтверждалась данными лабораторных исследований. В контрольной группе на фоне выраженного воспалительного процесса в ране увеличение количества лейкоцитов происходило до 3-х суток: к 3-м суткам числовые показатели составили  $14,75 \pm 0,3 \times 10^9/\text{л}$ , к 7-м –  $14,0 \pm 0,7 \cdot 10^9/\text{л}$ , к 14-м –  $13,6 \pm 0,7 \cdot 10^9/\text{л}$ . Затем на фоне проводимого лечения наблюдалась положительная динамика: к 21-м суткам лейкоцитоз снизился до  $13,0 \pm 65 \cdot 10^9/\text{л}$ , к 28-м – до  $11,55 \pm 0,7 \cdot 10^9/\text{л}$ , к 50-м – до  $10,62 \pm 0,9 \cdot 10^9/\text{л}$ . И только на 60-е сутки исследования у животных контрольной группы показатели уровня лейкоцитов соответствовали пределам нормы ( $8,24 \pm 0,4 \cdot 10^9/\text{л}$ ). В опытной группе до 3-х суток эксперимента также отмечался рост лейкоцитоза до  $14,74 \pm 0,5 \cdot 10^9/\text{л}$ . Однако нормализация показателей достигалась уже к 28-м суткам исследования и составляла  $9,92 \pm 0,7 \cdot 10^9/\text{л}$ . Данные представлены на рис. 1.

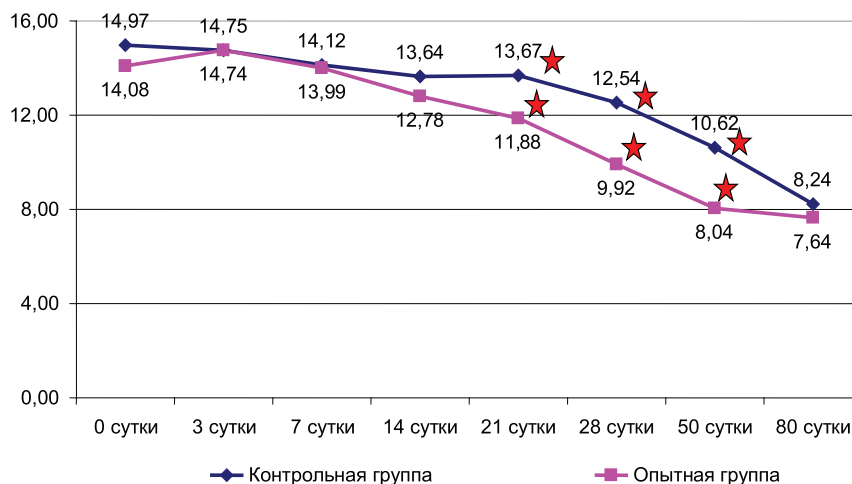


Рис. 1 Динамика показателей уровня лейкоцитов у животных контрольной и опытной групп. ★ – отмечены показатели, значимые на уровне  $p < 0,01$

В основной группе животных наряду с положительной динамикой репаративных процессов в ране при клиническом исследовании в течение всего периода эксперимента наблюдалось снижение микробной обсемененности. Количественные показатели микрофлоры, выделенной на 10-е сутки после операции, соответствовали  $1 \cdot 10^1 - 10^2$  КОЕ в мл, тогда как в экспериментальной группе этот же показатель составил  $1 \cdot 10^7$  КОЕ в мл. На 14-е сутки показатель микробной обсемененности раны у животных опытной группы составил  $1 \cdot 10^2$  КОЕ в мл, а в контрольной

группе варьировался от  $1 \cdot 10^5$  до  $1 \cdot 10^7$  КОЕ в мл. На 28-й день у всех животных основной группы рост микроорганизмов не определялся, в контрольной группе в 11 случаях количественные признаки микробной обсемененности раны оставались прежними или незначительно снижались, что объясняло клиническую картину продолжающегося инфекционного процесса. Полное подавление инфекции в контрольной группе было достигнуто к 50-м суткам, что подтверждалось отрицательными данными бактериологических исследований (рис. 2).

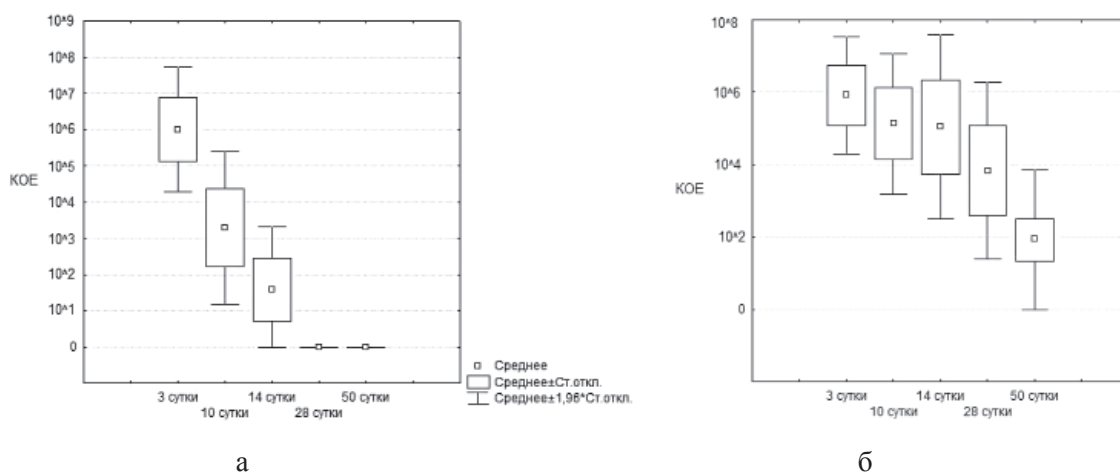


Рис. 2. Динамика показателей высеваемости патогенной микрофлоры ран животных контрольной (а) и опытной групп (б)

Косвенным показателем купирования инфекционного процесса является восстановление костных структур в зоне остеомиелитического процесса с активацией остеогенных структур, в частности, остеобластов. Маркером последних и одним из показателей, характеризующих интенсивность репаративных процессов в костной ткани, является щелочная фосфатаза, активность которой на 3-и сутки после перелома повысилась во всех группах животных по сравнению с исходными данными. В опытной группе наблюдали повышение уровня щелочной фосфатазы после операции с 3 и до 21-х суток эксперимента ( $267,33 \pm 0,36$  МЕ/л). К 50-м суткам исследования уровень щелочной фосфатазы продолжал повышаться и достиг максимальных величин ( $287,33 \pm 0,59$  МЕ/л), что связано с использованием антибактериального носителя и купированием воспалительного процесса в данной группе исследования. К 80-му дню уровень щелочной фосфатазы в группе достигал нормальных величин.

При изучении показателей щелочной фосфатазы у кроликов контрольной группы отмечали повышение уровня фермента к 3-м суткам ( $251,0 \pm 0,69$  МЕ/л). Однако на

протяжении всего времени эксперимента данные показатели оставались на прежнем уровне вплоть до 80-х суток исследования, что связано с затянувшимся воспалительным процессом, плохой опороспособностью конечности, слабой микроциркуляцией в зоне повреждения (рис. 3).

Помимо изучения маркеров остеобластов изучали также показатели минерального обмена – содержание общего кальция и неорганического фосфора в периферической крови экспериментальных животных. Количество кальция в сыворотке крови заметно повышалось в течение первых 14-и дней после операции, затем наблюдалось его снижение у кроликов опытной группы, на фоне применения антибактериального носителя и наличия благоприятных условий течения послеоперационного периода. У животных контрольной группы в отличие от кроликов опытной группы исследования наблюдали незначительное повышение уровня кальция в сыворотке крови на 7-е сутки ( $2,7 \pm 0,01$  ммоль/л), затем снижение данного показателя до исходных величин к 14-му дню и повышение его уровня лишь к 50-м суткам эксперимента ( $2,85 \pm 0,02$  ммоль/л).

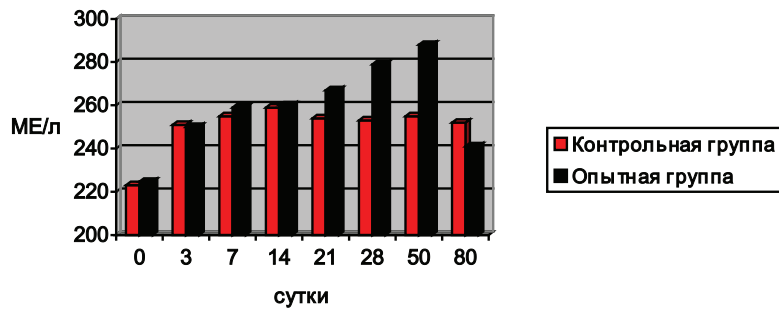


Рис. 3. Динамика изменения активности щелочной фосфатазы у животных контрольной и опытных групп

В дальнейшем, на 28-е сутки у кроликов опытной группы наблюдалось снижение уровня общего кальция, однако было достоверно выше фоновых показателей. Нормализация показателей у животных опытной группы наблюдалась к 80-м суткам (таблица). Изменение уровня неорганического фосфора имело тенденцию к повышению после операции и снижению к концу периода наблюдений. Содержание неорганиче-

ского фосфора в сыворотке крови кроликов опытной группы прогрессивно повышалось вплоть до 28 дня, что свидетельствует о длительной мобилизации данного элемента из различных депо организма животных. При изучении содержания количества неорганического фосфора сыворотки крови кроликов контрольной группы наблюдали аналогичную картину, что и при исследовании общего кальция (таблица).

Динамика изменения уровня кальция и фосфора в сыворотке крови кроликов (на 0, 3, 7, 14, 28, 50, 80-е сутки; (N группа 1 = 18, N группа 2 = 18, df = 1)

| Сутки исследования | Динамика изменения уровня кальция в сыворотке крови кроликов |      | Динамика изменения уровня фосфора в сыворотке крови кроликов |      |
|--------------------|--|------|--|------|
|                    | контроль   | опыт | контроль   | опыт |
| 0                  | 2,29   | 2,33 | 0,99   | 1,1  |
| 3                  | 2,37   | 2,4  | 1  | 1,1  |
| 7                  | 2,7  | 2,79 | 1,2  | 1,2  |
| 14                 | 2,41   | 3    | 1,1  | 1,35 |
| 21                 | 2,52   | 3,1  | 1  | 1,45 |
| 28                 | 2,5  | 2,82 | 0,9  | 1,8  |
| 50                 | 2,85   | 2,75 | 1,3  | 1,5  |
| 80                 | 2,82   | 2,35 | 1,4  | 1    |

Общей тенденцией изменений минерального обмена является то, что у животных опытной группы происходило более интенсивное снижение в сыворотке крови уровня общего кальция и фосфора. На наш взгляд, это также связано с более ранним купированием инфекционного процесса и, как следствие, – интенсивным потреблением данных элементов межотломковым регенератом при замещении костного дефекта.

Оценка состояния иммунных реакций неспецифической резистентности проводилась по реакции фагоцитоза со стафилококком, определением фагоцитарного числа и фагоцитарного индекса.

В ходе исследования неспецифической резистентности фагоцитарное число нейтрофилов и их поглотительная способность были ниже контрольных значений, а микробицидная способность выше. Хронизация

процесса приводила к снижению количества фагоцитирующих клеток и их поглотительной, миграционной и переваривающей функций, что отражено на рис. 4.

Фагоцитарная активность и миграционная способность нейтрофилов после операции снижались, однако в дальнейшем, к 50-м суткам после операции возвращались в обеих группах к дооперационным величинам (рис. 5).

Для определения функциональной активности иммунокомпетентных клеток, а также получения информации о тяжести воспалительного процесса и его переходе на системный уровень изучали содержание в крови провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (IL-2, IL-4, фактор некроза опухоли). В опытной группе анализ содержания цитокинов производился на 0, 7, 14, 30, 60 и 120 сутки с момента оперативного лечения.

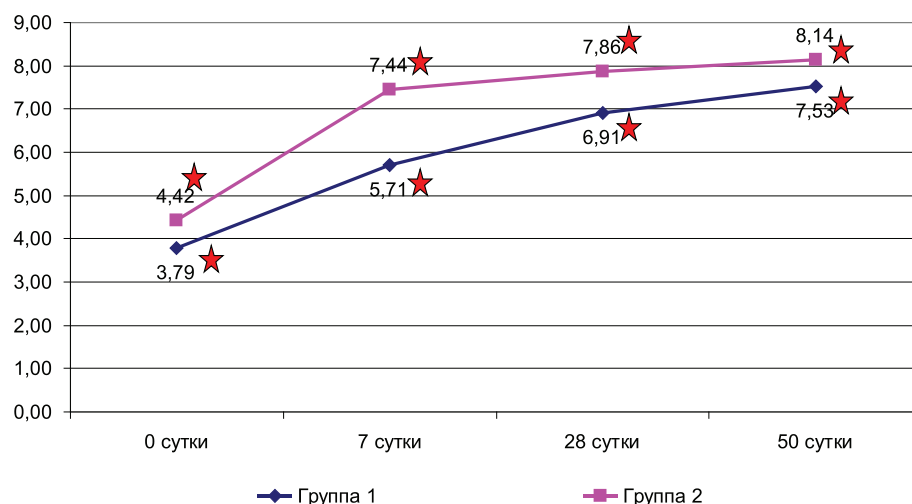


Рис. 4. Динамика изменения фагоцитарной активности лейкоцитов у опытной и контрольной групп животных (на 0, 3, 10, 14, 28, 50-е сутки; ANOVA Chi Sqr. ( $N$  группа 1 = 18,  $N$  группа 2 = 18,  $df = 1$ )). ★ – отмечены показатели, значимые на уровне  $p < 0,01$

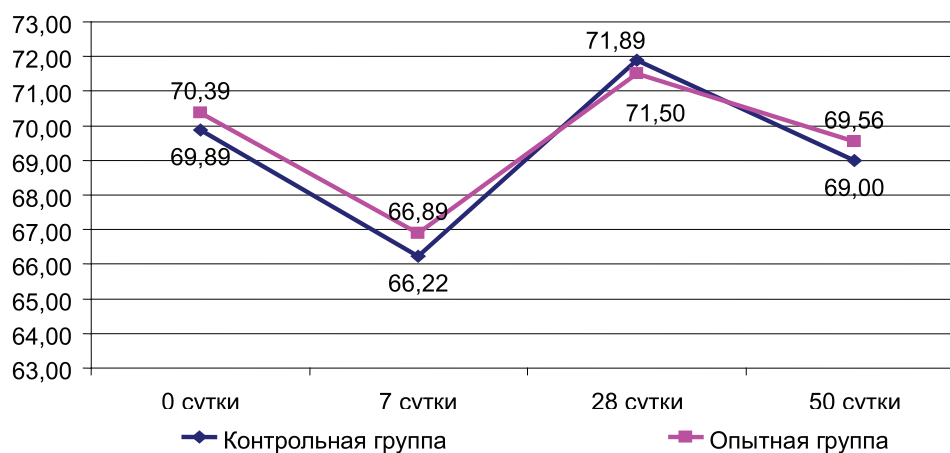


Рис. 5. Динамика изменения фагоцитарного показателя у контрольной и опытной групп животных (на 0, 3, 10, 14, 28, 50-е сутки; ANOVA Chi Sqr. ( $N$  группа 1 = 14,  $N$  группа 2 = 18,  $df = 1$ ))

Повышение уровня интерлейкин-2 и фактора некроза опухоли (ФНО) отмечалось на 7–14 сутки после оперативного лечения. Это, по нашему мнению, связано с наличием инородного тела (антибактериальный пролонгированный носитель) в области послеоперационного вмешательства и адекватного иммунного ответа с активацией воспалительных процессов в области инородного тела. Незначительное увеличение содержания уровня интерлейкина-4 в периферической крови на 7–14 сутки с момента операции свидетельствует о подавлении макрофагальной активности и процесса биосинтеза ИЛ-1, ФНО, ИЛ-6, то есть о противовоспалительном эффекте. А дальнейшее его снижение к 120-м суткам с момента операции свидетельствует об от-

сутствии воспаления в области оперативного вмешательства к концу лечения.

### Выводы

1. При использовании локального антибактериального носителя в комплексе хирургического лечения остеомиелита отмечается более интенсивное подавление инфекционного процесса в костной ране, чем при традиционном способе лечения, что подтверждается динамикой клинических, гематологических и бактериологических показателей.

2. Высокий уровень щелочной фосфатазы, сохраняющийся до 80-х суток эксперимента, временное снижение показателей кальция и фосфора свидетельствуют об активации репаративных процессов вследствие раннего подавления инфекции под

воздействием локального антибактериального имплантата.

3. Антибактериальный локальный цементный носитель при лечении хронического остеомиелита длинных трубчатых костей не оказывает депрессивного воздействия на общие и локальные механизмы иммунной защиты, что позволяет применять его даже в случаях запущенного хронического инфекционного процесса.

### Список литературы

1. Амирасланов Ю.А., Митиш В.А., Борисов И.В. Гнойные поражения костей и суставов. Избранный курс лекций по гнойной хирургии / под ред. В.Д. Федорова, А.М. Светухина. – М.: Миклош, 2007. – С. 89–109.
2. Профилактика госпитальной инфекции при реконструктивно-восстановительных операциях с помощью пролонгированной формы гентамицина на коллагеновой основе / Л.А. Блатун, А.М. Светухин, В.А. Митиш и др. // Клинич. фармакология и терапия. –1998. –т.7. –№ 2:0869-5490. – С. 30–33.
3. Оценка и прогнозирование эффективности лечения больных хроническим остеомиелитом / Н.М. Ключин, А.И. Лапынин, М.А. Ковинька, В.Е. Дегтярев // Гений ортопедии. – 2002. – № 1. – С. 27–30.
4. Никитин Г.Д. Хирургическое лечение остеомиелита / Г.Д. Никитин, А.В. Рак, С.А. Линник. – СПб.: Русская графика, 2000. – 288 с.
5. Показатели крови и лейкоцитарного индекса интоксикации в оценке тяжести и определении прогноза при воспалительных, гнойных и гнойно-деструктивных заболеваниях / В.К. Островский, А.В. Машенко, Д.В. Янголенко, С.В. Макаров // Клинич. лаб. диагностика. – 2006. – № 6. – С. 50–53.
6. Результаты применения разных видов замещения костных полостей при хирургическом лечении больных хроническим остеомиелитом / С.А. Линник, А.Н. Ткаченко, Р.В. Марковиченко, Е.С. Хачатрян, Ю.Н. Савушкин, А.В. Жарков // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 7 (часть 1). – С. 100–105.
7. Черепанов Е.А. Русская версия опросника Освестри: культурная адаптация и валидность // Хирургия позвоночника. – 2009. –№ 3. – С. 93–98.
8. Юнкеров В.И. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований / В.И. Юнкеров, С.Г. Григорьев, М.В. Резванцев. – СПб.: ВМееДА, 2011. – 318 с.
9. Buhne K.H. Imaging of posttraumatic osteomyelitis / K.H. Buhne, K. Bohndorf // Semin. Musculoskelet. Radiol. – 2004. – Vol. 8, № 3. – P. 199–204.
10. Risk factors for developing osteomyelitis in patients with diabetic foot wounds / L.A. Lavery, E.J. Peters, D.G. Armstrong [et al.] // Diab. Res. Clin. Pract. – 2009. – Vol. 83, № 3. – P. 347–52.
11. Lew, D.P. Osteomyelitis / D.P. Lew, F.A. Waldvogel // Lancet. – 2004. –Vol. 364 (9431). – P. 369–79.
12. Mader T. In Vitro evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated biodegradable beads and polymethylmethacrylate beads / T.Mader, J. Calhoun, J.Cobs // Antimicrob. Agents Chemother. – 1997. – Vol. 41, № 2. – P. 415–418.
13. Infection and Local Treatment in Orthopedic / E. Meani, C. Roman, L. Crosby, G. Hofmann. // Springer. – 2010. – P. 1–5, 21–25, 369–79.

### References

1. Amiraslanov J.A., Mitish V.A. Borisov I.V. Purulent lesions of bones and joints. Chosen course in contaminated surgery / Ed. V.D. Fedorov, A.M. Svetukhin. M. Miklos, 2007. pp. 89–109.
2. Blatun L.A., Svetukhin A.M., Mitish V.A. et al Prevention of nosocomial infections in reconstructive operations using long-acting form of gentamicin on collagen matrix // clinical. Pharmacology and Therapeutics, 1998. Volume 7, N N2 :0869-5490., pp. 30–33
3. Klyushin N.M. Assessing and predicting the effectiveness of treatment of patients with chronic osteomyelitis / N.M. Klyushin, A.I. Lapyinin, M.A. Kovinka, V.E. Degtyarev // Genius orthopedics. 2002. no. 1. pp. 27–30.
4. Nikitin G.D. Surgical treatment of osteomyelitis / G.D. Nikitin, A.V. Cancer, S.A. Linnik. St. Petersburg.: Russian graphics, 2000. 288.
5. Ostrovsky V.K.? Mashchenko A.V.? Yangolenko D.V., Makarov S.V. The blood counts and leukocyte index of intoxication in assessing the gravity and determining the prognosis of inflammatory, festering and purulent-destructive diseases // Mountain. Lab. diagnostics. 2006. no. 6., pp. 50–53.
6. Linnik S.A., A. Tkachenko, Markovichenko R. Khachatryan, E.S., Savushkin J.N., A.V. Zharkov The results of the application of different types of replacement of bone cavities in the surgical treatment of patients with chronic osteomyelitis // Basic research. 2012. no. 7 (Part 1). pp. 100–105.
7. E.A. Cherepanov Russian version of the Oswestry questionnaire: cultural adaptation and validity // Spine Surgery. no. 3 in 2009. pp. 93–98.
8. Junkerov V.I. Mathematical and statistical processing of medical research data / V.I. Junker, S.G. Grigorev, M.V. Rezvantsev. St. Petersburg: VMeedA, 2011. 318 p.
9. Buhne K.H. Imaging of posttraumatic osteomyelitis / K.H. Buhne, K. Bohndorf // Semin. Musculoskelet. Radiol. 2004. Vol. 8, no. 3. pp. 199–204.
10. Risk factors for developing osteomyelitis in patients with diabetic foot wounds / L.A. Lavery, E.J. Peters, D.G. Armstrong [et al.] // Diab. Res. Clin. Pract. 2009. Vol. 83, no. 3. pp. 347–52.
11. Lew D.P. Osteomyelitis / D.P. Lew, F.A. Waldvogel // Lancet. 2004. Vol. 364 (9431). pp. 369–79.
12. Mader T. In Vitro evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated biodegradable beads and polymethylmethacrylate beads / T. Mader, J. Calhoun, J. Cobs // Antimicrob. Agents Chemother. 1997. Vol. 41, no. 2. pp.415–418.
13. Infection and Local Treatment in Orthopedic / E. Meani, C. Roman, L. Crosby, G. Hofmann // Springer. 2010. pp.1–5, 21–25, 369–79.

**Рецензенты:**  
 Федорова Г.В., д.м.н., профессор кафедры общественного здоровья и здравоохранения, ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия», г. Омск;  
 Солдатов Ю.П., д.м.н., профессор, руководитель учебного отдела, ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган.  
 Работа поступила в редакцию 01.07.2013.