

На правах рукописи

АНТИПОВ

Александр Павлович

**РАЗРАБОТКА И НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
ОРИГИНАЛЬНОГО ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА С
АНТИМИКРОБНЫМИ СВОЙСТВАМИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ХРОНИЧЕСКОГО ОСТЕОМИЕЛИТА**

(экспериментально-клиническое исследование)

3.1.8. Травматология и ортопедия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург

2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Р.Р. Вредена» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук профессор **Божкова Светлана Анатольевна**

Официальные оппоненты:

Ермаков Артем Михайлович – доктор медицинских наук, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России, Клиника гнойной остеологии, руководитель.

Рукин Ярослав Алексеевич – доктор медицинских наук, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России, научный отдел костно-суставной патологии, ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «16» декабря 2025 года в ____ часов на заседании объединенного диссертационного совета 99.0.008.02 в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Р.Р. Вредена» Минздрава России (195427, Санкт-Петербург, ул. Академика Байкова, дом 8).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ ТО им. Р.Р. Вредена» Минздрава России и на сайте <http://dissovet.rniito.ru/>

Автореферат разослан «_____» _____ 2025 г.

Ученый секретарь объединенного диссертационного совета 99.0.008.02

доктор медицинских наук



Денисов А.О.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Лечение хронической инфекции костей, или хронического остеомиелита, представляет собой одну из наиболее сложных и до конца нерешённых проблем современной гнойной хирургии и ортопедии. Заболевание характеризуется длительным, рецидивирующим течением, высоким риском необходимости выполнения калечащих операций и последующей инвалидизации пациентов, что создаёт колоссальную социально-экономическую нагрузку на систему здравоохранения [6, 163]. Частота рецидивов достигает 20-35%, а стоимость лечения одного пациента может составлять до 150 000 долларов США [109]. Ключевым элементом успешного лечения является адекватное замещение костной полости, так называемого «мертвого пространства», сформированного в ходе радикальной хирургической обработки очага инфекции. Оставление этого дефекта незаполненным создает условия для формирования гематомы, служащей питательной средой для остаточной микрофлоры, и неизбежно ведет к рецидиву инфекции в 10-20% случаев [119, 155].

Современные вызовы в лечении хронического остеомиелита обусловлены комплексом взаимосвязанных патогенетических факторов. Ключевой проблемой является глобальный рост антибиотикорезистентности, в частности, распространение метициллинрезистентных штаммов (MRSA), что значительно ограничивает выбор эффективных препаратов [27]. Ситуация усугубляется фундаментальной способностью патогенов формировать защитные биопленки как в некротизированной костной ткани, так и на поверхности имплантатов [12, 177]. Бактерии внутри биопленки переходят в метаболически неактивное состояние, формируя популяцию персистеров, для эрадикации которых требуются концентрации антибиотиков, в 100-1000 раз превышающие минимальные ингибирующие [110]. Особую сложность представляет способность микроорганизмов, в частности *S. aureus*, к внутриклеточной персистенции в остеобластах и инвазии в остеоцитарную лакунарно-канальцевую сеть, формируя глубокие, недоступные для иммунной системы

резервуары инфекции и фенотипические варианты малых колоний (Small Colony Variants, SCVs) [46].

Эти факторы замыкают «порочный круг» патогенеза: инфекция провоцирует воспаление и тромбоз сосудов, что ведет к ишемии и некрозу кости с формированием аваскулярных секвестров. Секвестры, в свою очередь, служат идеальным субстратом для персистенции биопленок, будучи недоступными для защитных сил организма [86]. В таких условиях системная антибактериальная терапия часто оказывается малоэффективной из-за невозможности достижения необходимой концентрации препаратов в ишемизированном очаге поражения [165]. В связи с этим единственно верной стратегией становится создание высоких локальных концентраций антимикробных препаратов с использованием костнопластических материалов-носителей, способных преодолеть защитные барьеры бактерий [50, 72].

Исторически «золотым стандартом» для локальной доставки антибиотиков являлся костный цемент на основе полиметилметакрилата (ПММА). Однако его применение сопряжено с рядом фундаментальных недостатков: являясь небиodeградируемым, он требует второго этапа оперативного лечения для своего удаления, а его фармакокинетика далека от идеала — после резкого начального выброса концентрация антибиотика стремительно падает, при этом общее высвобождение составляет менее 10% от загруженной дозы [19, 21, 67]. Другие биodeградируемые носители, такие как сульфат кальция или гидрогели, не обладают достаточной механической прочностью. На этом фоне особый интерес представляет использование костных аллотрансплантатов, которые, согласно классификации Nandi, являются оптимальной альтернативой аутологичной кости [107]. Их уникальная пористая структура обеспечивает возможность создания высоких локальных концентраций и длительной элюции антибиотика, сочетая это со структурными и osteoconductive свойствами нативной кости [2, 161].

В странах Европейского союза уже зарегистрированы и успешно применяются коммерческие материалы на основе импрегнированной аллокости (например, OSTEOMycin® Orthopaedic; AlloMatrix®), демонстрирующие

клиническую эффективность до 90% при двухлетнем наблюдении [160]. Однако в российской медицинской практике стандартизированные и зарегистрированные методики импрегнции аллокости антимикробными препаратами отсутствуют, что создаёт определенный терапевтический вакуум. Таким образом, разработка и внедрение отечественной технологии создания остеопластического материала на основе аллокости с прогнозируемой и пролонгированной элюцией антибиотиков представляется крайне актуальным и перспективным направлением научных исследований, способным существенно улучшить результаты лечения пациентов с ортопедической инфекцией.

Степень разработанности проблемы

На сегодняшний день накоплен значительный объем данных о патогенезе хронического остеомиелита, значении биопленок, внутриклеточной персистенции *Staphylococcus aureus* и нарушений локальной перфузии как ключевых причин хронизации и рецидивов инфекционного процесса. Радикальная хирургическая санация признана обязательным условием лечения, а локальная антибиотикотерапия – критическим компонентом, позволяющим достигать бактерицидных концентраций препаратов в аваскулярных зонах. Многолетнее широкое применение ПММА-цемента в качестве материала-носителя антимикробных препаратов выявило значимые недостатки этого остеозамещающего материала, к которым относят необходимость его удаления и неблагоприятную фармакокинетику высвобождения антибиотиков. Биодegradируемые системы на основе солей кальция и фосфатов кальция демонстрируют клиническую эффективность, однако при простом смешивании с антибиотиками ограничены быстрой «взрывной» элюцией. Полимерные депо (ПЛГА, гидрогели) обеспечивают программируемое высвобождение, но лишены остеогенных свойств и также нередко дают начальный пик концентраций. Костные трансплантаты (ауто-/алло) остаются биологически наиболее перспективными носителями, однако их смешивание с антибиотиками или замачивание в растворе, характеризуется быстрым высвобождением препарата, а

медицинские изделия в виде остеозамещающих материалов на основе аллокости, импрегнированные антибиотиками и обеспечивающие их пролонгированную элюцию, в РФ не зарегистрированы. Таким образом, отсутствие в настоящее время в РФ остеозамещающего материала с наличием остеоиндуктивных и остеокондуктивных свойств, а также пролонгированной антимикробной активностью для лечения пациентов с хроническим остеомиелитом, определило необходимость проведения данного диссертационного исследования и позволило сформулировать его цель и задачи.

Цель исследования – разработать технологию изготовления оригинального остеопластического материала с контролируемым локальным высвобождением ванкомицина, изучить в экспериментах *in vitro* и *in vivo* свойства полученного материала, а также оценить его клиническую эффективность при комплексном лечении пациентов с хроническим остеомиелитом.

Задачи

1. Разработать способ получения лиофилизированного биodeградируемого костнопластического материала, а также оценить его прочностные и биологические характеристики в экспериментах *in vitro*.
2. Провести *in vivo* сравнительную оценку перифокальных тканевых реакций на имплантацию оригинального костнопластического материала и свежезамороженной кости в полостной асептический дефект большеберцовой кости у кроликов.
3. Изучить влияние различных параметров насыщения на кинетику элюции ванкомицина из пористых остеопластических материалов и предложить оригинальный способ импрегнации.
4. Изучить в эксперименте *in vivo* эффективность купирования инфекционного процесса и перифокальные тканевые реакции при замещении остеомиелитического дефекта оригинальным импрегнированным ванкомицином

остеопластическим материалом в сравнении с биоккомпозитным материалом на основе β -трикальцийфосфата и гидроксиапатита.

5. Провести сравнительный анализ клинической эффективности комплексного лечения пациентов с хроническим остеомиелитом костей верхних и нижних конечностей с применением оригинального остеопластического материала, импрегнированного ванкомицином, в сравнении с биоккомпозитным материалом на основе β -трикальцийфосфата и гидроксиапатита.

Научная новизна

1. Разработан оригинальный способ очистки и обработки губчатой аллогенной кости, который позволяет сохранить микроархитектонику костного матрикса при полном удалении клеточных элементов и липидов, получен патент на изобретение RU2722266C1 «Лиофилизированный биологический биodeградируемый минерализованный костнопластический материал и способ его изготовления».

2. Определены ключевые факторы, влияющие на эффективность импрегнации и продолжительность антимикробной активности лиофилизированной губчатой кости.

3. Разработан оригинальный способ импрегнации лиофилизированной губчатой аллокости ванкомицином, обеспечивающий пролонгированное высвобождение антибиотика, получен патент на изобретение RU2839413C1 «Способ импрегнации пористых материалов антибактериальными препаратами для одномоментного замещения остеомиелитических дефектов и создания депо антимикробных препаратов».

4. Впервые в эксперименте на кроликах получены данные об особенностях ремоделирования оригинального остеопластического материала.

5. С применением метода гистоморфометрии изучена динамика процессов интеграции импрегнированного ванкомицином оригинального костнопластического материала в условиях экспериментального хронического

остеомиелита и определены корреляционные взаимосвязи между параметрами воспаления, резорбции и остеогенеза.

Практическая значимость

Разработанная технология позволяет получать стандартизированный остеопластический материал с пролонгированными антимикробными свойствами для эффективного лечения хронического остеомиелита.

Определен оптимальный срок хранения импрегнированного ванкомицином оригинального костнопластического материала, в течение которого сохраняется его активность и стерильность.

В экспериментах *in vivo* доказана безопасность и эффективность разработанного материала в отношении купирования инфекции и восстановления анатомической целостности кости, что позволило провести клиническую апробацию костнопластического материала на ограниченной группе пациентов с хроническим остеомиелитом.

Установлена сопоставимая с биокомпозитным материалом на основе β -трикальцийфосфата и гидроксиапатита эффективность применения импрегнированного ванкомицином оригинального костнопластического материала в комплексном лечении ограниченной группы пациентов с хроническим остеомиелитом.

Методология и методы исследования

Для достижения поставленной цели и решения задач методология исследования включала последовательное выполнение серий экспериментов *in vitro*, *in vivo* и амбиспективное клиническое исследование.

Экспериментальная часть *in vitro* была направлена на разработку и всестороннюю оценку свойств оригинального остеопластического материала. Технология его получения включала многоэтапную физико-химическую очистку аллогенных головок бедренных костей с использованием растворов перекиси водорода, гидрокарбоната натрия, этанола в сочетании с ультразвуковой кавитацией и орбитальным встряхиванием с последующей лиофилизацией.

Оценка качества материала проводилась методами сканирующей электронной микроскопии и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии. Биомеханические свойства (предел прочности, модуль упругости) оценивали в тестах на одноосное сжатие. Биосовместимость и остеоиндуктивный потенциал изучали на культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток кролика с применением МТТ-теста, окраски ализариновым красным и ПЦР в реальном времени для оценки экспрессии генов BMP2 и RUNX2. Для разработки метода импрегнации материала ванкомицином были изучены различные методики с варьированием давления, времени импрегнации и состава растворителя. Антимикробную активность и кинетику элюции оценивали микробиологическим методом и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Стабильность материала при хранении оценивали на протяжении 24 месяцев.

Экспериментальная часть *in vivo* была выполнена на 36 кроликах породы Советская шиншилла. В первой серии на модели асептического дефекта большеберцовой кости (n=18) сравнивали остеointegrацию разработанного материала и свежзамороженной аллокости. Во второй серии на модели хронического остеомиелита (n=18) изучали эффективность импрегнированного ванкомицином материала в сравнении с коммерческим аналогом на основе β -ТКФ/ГА. Оценку проводили на 14, 45 и 90 сутки с использованием рентгенографии, микробиологического исследования (подсчет КОЕ/г) и гистологического анализа с морфометрией по стандартам ASBMR.

Клиническая часть представляла собой одноцентровое амбиспективное сравнительное исследование с участием 50 пациентов с хроническим остеомиелитом. Основная группа (n=25) получала разработанный материал, группа сравнения (n=25) – коммерческий материал β -ТКФ/ГА. Оценивали интра- и послеоперационные показатели, динамику лабораторных маркеров (СРБ, лейкоциты), локальную концентрацию ванкомицина в дренажном отделяемом (ВЭЖХ), результаты интраоперационного микробиологического исследования и частоту рецидивов при минимальном сроке наблюдения 24 месяца.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием параметрических (ANOVA с тестом Тьюки) и непараметрических (критерии Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса, χ^2 , точный критерий Фишера) методов, корреляционного (Спирмен, Пирсон) и регрессионного анализа.

Положения, выносимые на защиту

Применение многоэтапной физико-химической обработки аллогенной костной ткани позволяет получать лиофилизированный биodeградируемый остеопластический материал, который при полном удалении иммуногенных компонентов сохраняет нативную трехмерную архитектуру, обладает улучшенными биомеханическими характеристиками, биосовместимостью и выраженным остеоиндуктивным потенциалом.

Импрегнация остеопластического пористого материала на основе аллокости в условиях отрицательного давления в спиртовом растворе ванкомицина, содержащим полимер, обеспечивает пролонгированную антимикробную активность с высоким суммарным высвобождением препарата.

Применение оригинального импрегнированного ванкомицином остеопластического материала, на реконструктивном этапе лечения пациентов с хроническим остеомиелитом обеспечивает клиническую эффективность, сопоставимую с коммерческим биокомпозитным материалом.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Цель, задачи, содержание и выводы диссертации полностью соответствуют паспорту научной специальности 3.1.8. Травматология и ортопедия.

Апробация и реализация результатов исследования

Основные положения диссертационного исследования были представлены и обсуждены на региональных и всероссийских научных конференциях: Всероссийской конференции молодых ученых «Травматология и ортопедия. Прошлое, настоящее и будущее...», посвященной 350-летию со дня рождения

Петра I (Санкт-Петербург, 2021), Межрегиональной научно-практической конференции «Колокольцевские чтения» (Нижний Новгород, 2021), II съезде травматологов-ортопедов Центрального федерального округа (Смоленск, 2024), Ежегодной научно-практической конференции с международным участием «Вреденовские чтения» (Санкт-Петербург, 2024).

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований, а также получено 2 патента на изобретения (RU2722266C1 и RU2839413C1).

Результаты диссертационного исследования являются основой для создания линии по производству медицинских изделий в форме остеозамещающего материала с антибактериальными (АБ) свойствами для лечения пациентов с хроническим остеомиелитом.

Результаты диссертационного исследования используются при обучении ординаторов, аспирантов и травматологов-ортопедов, проходящих усовершенствование по программам дополнительного образования в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена» Минздрава России.

Личный вклад автора

Диссертант самостоятельно провел анализ профильной отечественной и зарубежной научной литературы, самостоятельно проводил эксперименты по отработке методики очистки материала и разработке способа импрегнации, участвовал в экспериментах *in vitro*, лично выполнил экспериментальные исследования на животных. Собрал данные из медицинской документации и отсроченные результаты лечения пациентов ретроспективной части исследования, принимал непосредственное участие в лечении профильных больных проспективной части исследования, являясь их лечащим врачом и выполняя хирургические вмешательства, провел сбор первичных данных, исходов лечения, выполнил статистический анализ, интерпретацию полученных

результатов исследований, сформулировал выводы и практические рекомендации, написал все главы диссертации и ее автореферат.

Объем и структура диссертации

Материалы диссертационного исследования представлены на 157 страницах. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы по материалам и методам исследования, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Работа содержит 12 таблиц и 20 рисунков. Список литературы включает 178 источников: из них 17 – отечественных и 161 – иностранных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы исследования, которая обусловлена высокой частотой рецидивов хронического остеомиелита, ограниченной эффективностью системной антибактериальной терапии и недостатками существующих систем локальной доставки антибиотиков. Сформулированы цель и задачи исследования, освещены его научная новизна и практическая значимость. Изложены основные положения, выносимые на защиту, а также представлены сведения о реализации, апробации работы, объеме и структуре диссертации.

В **первой главе** «Современное представление о проблеме использования остеозамещающих материалов при лечении хронического остеомиелита (аналитический обзор литературы)» представлен анализ отечественных и зарубежных научных публикаций. Подчеркивается, что хронический остеомиелит остается одной из наиболее сложных проблем гнойной хирургии и ортопедии, характеризуясь высокой частотой рецидивов (до 35%) и значительной социально-экономической нагрузкой.

Рассмотрены ключевые аспекты патогенеза, определяющие низкую эффективность стандартных подходов к лечению: формирование бактериальных биопленок, внутриклеточная персистенция возбудителей (включая инвазию в

остеоцитарную лакунарно-канальцевую сеть) и нарушение локального кровоснабжения с образованием аваскулярных секвестров. Доминирующим возбудителем остается *S. aureus*, при этом отмечается рост значимости коагулазонегативных стафилококков и грамотрицательных микроорганизмов, а также глобальная проблема антибиотикорезистентности, в частности распространение MRSA.

Обосновано, что основой лечения является радикальная хирургическая обработка очага инфекции с последующей локальной антибиотикотерапией. Проведен анализ существующих систем локальной доставки антибиотиков: небiodeградируемых (ПММА), biodeградируемых на основе солей кальция и синтетических полимеров. Выявлены их существенные недостатки, такие как необходимость повторной операции для удаления, неоптимальный фармакокинетический профиль, низкая механическая прочность и отсутствие остеогенного потенциала. Установлено противоречие: материалы с оптимальной фармакокинетикой не обладают достаточной биоактивностью и прочностью, тогда как костные трансплантаты демонстрируют неудовлетворительный профиль высвобождения препаратов. Это определяет острую клиническую потребность в разработке biodeградируемого остеопластического материала с пролонгированной антимикробной активностью, что и послужило основанием для выполнения настоящего исследования.

Во **второй главе** «Материалы и методы исследования» представлена подробная характеристика всех этапов работы, включая экспериментальную (*in vitro* и *in vivo*) и клиническую части.

Экспериментальная часть *in vitro* была направлена на разработку и стандартизацию технологии получения оригинального остеопластического материала. В качестве сырья использовали головки бедренных костей человека, полученные при эндопротезировании. Разработан многоэтапный протокол физико-химической очистки и лиофилизации. Качество материала оценивали методами сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и энергодисперсионной спектроскопии (ЭДС). Биомеханические свойства (модуль

упругости, предел прочности) изучали на стандартизированных образцах кости крупного рогатого скота в испытаниях на одноосное сжатие. Биосовместимость и остеоиндуктивный потенциал оценивали на культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) кролика с помощью МТТ-теста и анализа экспрессии генов *BMP2* и *RUNX2*. Была проведена оптимизация методики импрегнации материала ванкомицином путем варьирования давления, времени и состава растворителя. Антимикробную активность и кинетику элюции антибиотика определяли микробиологическими методами и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Экспериментальная часть *in vivo* выполнена на 36 кроликах породы Советская шиншилла. В первой серии на 18 животных моделировали асептический дефект большеберцовой кости для сравнительной оценки остеointеграции разработанного материала и свежесамороженной аллокости. Во второй серии на 18 животных моделировали хронический остеомиелит, вызванный *S. aureus*, для оценки эффективности материала, импрегнированного ванкомицином, в сравнении с коммерческим аналогом ReproBone®. Оценку проводили на 14, 45 и 90 сутки с использованием гистологического, морфометрического, микробиологического и рентгенологического методов.

Клиническая часть исследования представляла собой одноцентровое амбиспективное сравнительное исследование с участием 50 пациентов с хроническим остеомиелитом, которым выполнялся второй этап хирургического лечения (см. таблицу 1). Пациенты были разделены на две группы: основную (n=25), где применялся разработанный оригинальный материал с ванкомицином, и группу сравнения (n=25), где использовался коммерческий материал ReproBone® с ванкомицином. Оценивались интра- и послеоперационные показатели, лабораторные маркеры воспаления, локальная концентрация ванкомицина в раневом отделяемом, результаты микробиологических исследований и частота рецидивов инфекции при минимальном сроке наблюдения 24 месяца.

Статистический анализ данных проводился с использованием параметрических и непараметрических методов, корреляционного и регрессионного анализа. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Таблица 1 – Сравнительный анализ исходных характеристик пациентов исследуемых групп

Показатель	Группы		p
	сравнения (n=25)	основная (n=25)	
Демографические характеристики			
Возраст, лет (Me [Q1; Q3])	41.0 [30.0; 53.0]	44.5 [33.5; 52.8]	0.338†
Пол, n (%)			1.000‡
- Мужской	17 (68.0%)	17 (68.0%)	
- Женский	8 (32.0%)	8 (32.0%)	
Характеристика остеомиелита			
Локализация, n (%)			0.069‡
- Бедро	6 (24.0%)	11 (44.0%)	
- Голень	17 (68.0%)	10 (40.0%)	
- Плечо	2 (8.0%)	2 (8.0%)	
- Стопа	0 (0.0%)	2 (8.0%)	
Этиология, n (%)			0.462‡
- Вторичный	19 (76.0%)	22 (88.0%)	
- Гематогенный	6 (24.0%)	3 (12.0%)	
Классификация Cierny-Mader			
- Анатомический тип 3, n (%)	23 (92.0%)	23 (92.0%)	1.000*
- Анатомический тип 4, n (%)	2 (8.0%)	2 (8.0%)	
- Физиологический класс B, n (%)	25 (100.0%)	23 (92.0%)	0.235*
- Физиологический класс A, n (%)	0 (0.0%)	2 (8.0%)	
Длительность заболевания, лет, Me (25–75% МКИ)	3,5 (1-8,5)	5 (2-19)	0,344§
Количество предшествующих операций (Me [Q1; Q3])	1.0 [1.0; 3.0]	3.0 [1.8; 4.0]	0.027§
Лабораторные показатели при поступлении			
СРБ, мг/л (Me [Q1; Q3])	1.0 [0.5; 3.0]	0.4 [0.4; 0.5]	0.001§
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л (Me [Q1; Q3])	6.0 [4.9; 7.0]	6.8 [6.0; 7.7]	0.114§

Примечания:

§ U-тест Манна-Уитни

‡ Критерий χ^2

* Точный критерий Фишера

В третьей главе «Разработка и экспериментальное исследование свойств оригинального остеопластического материала» представлены результаты создания и всестороннего изучения разработанного материала.

Разработан и стандартизирован пятифазный протокол получения лиофилизированного минерально-коллагенового матрикса. Результаты СЭМ подтвердили, что протокол позволяет эффективно удалять клеточные и жировые компоненты при полном сохранении нативной трехмерной архитектоники губчатой кости. По данным ЭДС, элементный состав материала (Са/Р соотношение) соответствовал природному гидроксиапатиту. Биомеханические испытания показали, что после лиофилизации материал обладал сопоставимой с нативной костью пластичностью (32,2% против 35,4%) при более высоком пределе прочности (16,0 МПа против 8,8 МПа) (см. таблицу 2).

Исследования *in vitro* продемонстрировали высокую биосовместимость материала и его выраженный остеоиндуктивный потенциал, подтвержденный активной пролиферацией и остеогенной дифференцировкой ММСК.

В эксперименте *in vivo* на модели асептического дефекта у кроликов разработанный материал показал значительные преимущества перед свежемороженой аллокостью. К 90-м суткам в основной группе наблюдалось практически полное ремоделирование дефекта с формированием зрелой пластинчатой кости, в то время как в контрольной группе сформировалось стойкое несращение с инкапсуляцией костных фрагментов фиброзной тканью.

Таблица 2 – Характеристики исследованных образцов костной ткани, $M \pm m$

Показатель	Группа 1 (Свежемороженая кость, n=8)	Группа 2 (Химическая очистка, n=13)	Группа 3 (Очистка + лиофилизация, n=11)	P
Геометрические параметры				
Ширина, мм	7,7 ± 0,6	7,6 ± 0,4	7,4 ± 0,4	0,927
Толщина, мм	7,1 ± 0,4	6,9 ± 0,3	7,0 ± 0,4	0,914
Площадь поперечного сечения, мм ²	52,9 ± 2,0	50,8 ± 1,3	50,7 ± 2,5	0,723
Биомеханические характеристики				
Максимальное усилие, Н	452,2 ± 83,1	1022,3 ± 181,8	848,8 ± 246,3	0,164
Предел прочности, МПа	8,8 ± 1,9	20,3 ± 3,6	16,0 ± 4,2	0,116
Модуль упругости, МПа	139,5 ± 34	345,5 ± 28	193,6 ± 41,4	0,009*
Относительная деформация при разрушении, %	35,4 ± 6,3	10,7 ± 2,7	32,2 ± 7,7	0,007*

В четвертой главе «Разработка способа импрегнации и особенности ремоделирования разработанного остеопластического материала с антимикробной активностью» изложены результаты оптимизации методики насыщения материала ванкомицином и его оценка на модели хронического остеомиелита.

Сравнительный анализ семи методик импрегнации показал, что ключевыми факторами эффективности являются давление, состав растворителя и время экспозиции. Оптимальной признана методика вакуумной импрегнации в 50% этаноле с 5% поливинилпирролидоном, которая обеспечила антимикробную активность *in vitro* против MRSA до 14 суток (см. рисунок 1). Кинетика элюции характеризовалась высоким начальным высвобождением (до 82 755 мкг/мл в первые сутки) с последующим пролонгированным выходом терапевтических концентраций. Установлена сильная положительная корреляция ($r = 0,908$) между концентрацией антибиотика (ВЭЖХ) и диаметром зоны подавления роста. Срок годности материала с сохранением стабильных антимикробных свойств определен в 18 месяцев. На разработанный способ импрегнации получен патент РФ на изобретение.

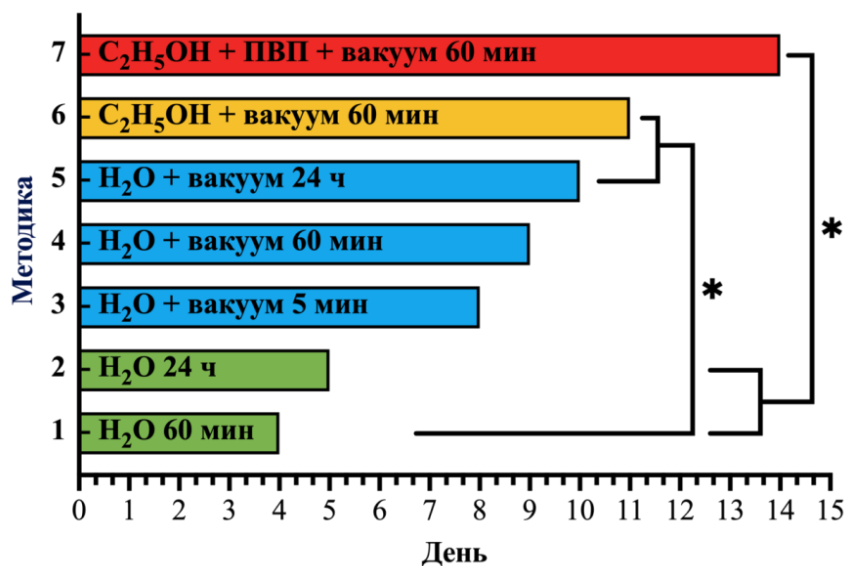


Рисунок 1 – Длительность антимикробной активности *in vitro* образцов с различными способами импрегнации

Примечание: * - $p < 0.05$ (ANOVA, post-hoc тест Тьюки).

В эксперименте *in vivo* на модели хронического остеомиелита у кроликов применение разработанного материала с ванкомицином привело к полной эрадикации инфекции во всех случаях. Гистоморфометрический анализ выявил физиологическое течение репаративных процессов: статистически значимое снижение площади воспаления (с 78,2% до 32,7% к 90-м суткам; $p < 0,001$) и прогрессивное нарастание остеобластической активности (с 4,0% до 11,4%; $p = 0,016$).

В пятой главе «Эффективность применения импрегнированных ванкомицином остеопластических материалов при лечении пациентов с хроническим остеомиелитом» представлены результаты клинической апробации разработанного материала.

Применение оригинального материала в основной группе ($n=25$) в сравнении с коммерческим аналогом в группе сравнения ($n=25$) было ассоциировано со статистически значимым сокращением времени операции (60 мин против 80 мин; $p = 0,002$) при замещении дефектов большего объема (40 мл против 15 мл; $p = 0,002$).

Локальная концентрация ванкомицина в ране в первые сутки в основной группе была более чем в 10 раз выше, чем в группе сравнения (3119,5 мкг/мл против 280 мкг/мл; $p = 0,030$), с сохранением высоких терапевтических уровней на протяжении всего периода дренирования (см. рисунок 2). Более выраженная послеоперационная воспалительная реакция (повышение СРБ) в основной группе носила асептический характер и прямо коррелировала с большим объемом замещенного дефекта ($r = 0,346$; $p = 0,014$).

Клиническая эффективность была высокой в обеих группах: частота рецидивов инфекции составила 4,0% (1/25) в основной группе и 8,0% (2/25) в группе сравнения ($p = 1,000$) при среднем сроке наблюдения более 2 лет (см. рисунок 3). Ключевым прогностическим фактором неблагоприятного исхода явилась персистенция инфекции на момент второго этапа лечения: все рецидивы зафиксированы у пациентов с положительными результатами интраоперационных посевов. Долгосрочные результаты МСКТ у пациентов

основной группы подтвердили полную остеоинтеграцию и ремоделирование материала без признаков рецидива инфекции.

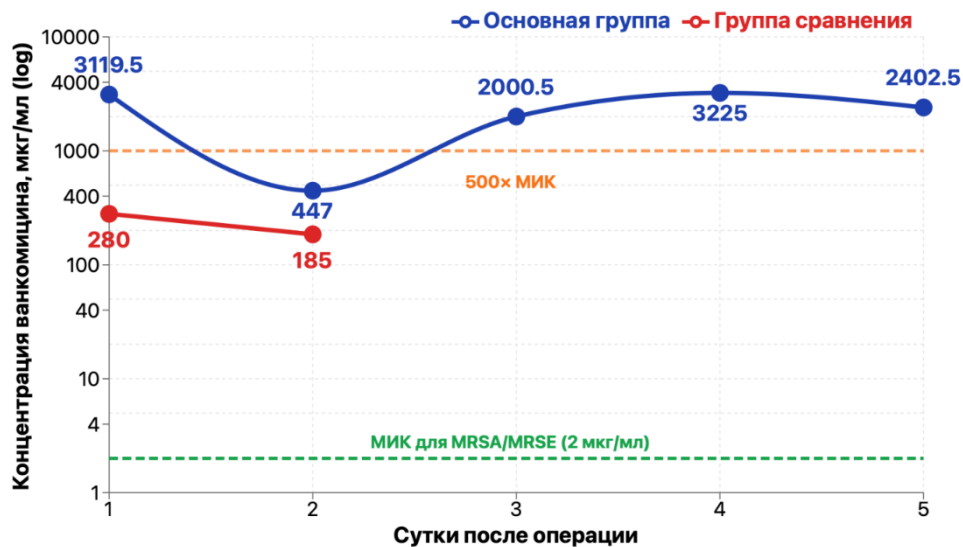


Рисунок 2 – Динамика концентрации ванкомицина в дренажном отделяемом

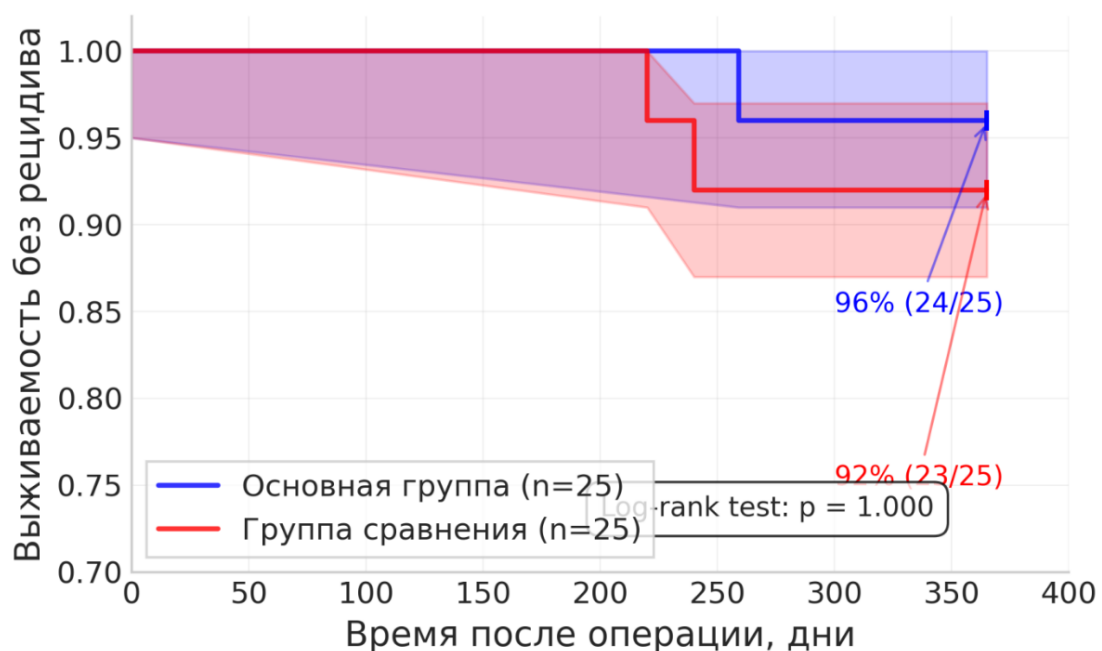


Рисунок 3 – Кривая выживаемости без рецидива инфекции

В **заключении** подведены общие итоги работы. Разработанная и всесторонне изученная технология получения оригинального остеопластического материала на основе аллокости с пролонгированной

элюцией ванкомицина продемонстрировала высокую эффективность. Материал обладает оптимальными биомеханическими и биологическими свойствами, обеспечивает создание высоких локальных концентраций антибиотика, достаточных для эрадикации инфекции, и стимулирует полноценную костную регенерацию. Клиническая апробация подтвердила его эффективность и безопасность, сопоставимую с коммерческим аналогом, при наличии ряда интраоперационных и фармакокинетических преимуществ. Полученные результаты обосновывают перспективность внедрения разработанного материала в клиническую практику для лечения пациентов с хроническим остеомиелитом.

Выводы

1. Разработанный способ позволил получить лиофилизированный биodeградируемый костнопластический материал из аллогенных головок бедренных костей с сохранением трехмерной архитектоники и улучшенными механическими свойствами в сравнении с нативной замороженной губчатой костью, характеризующийся остеоиндуктивными свойствами за счет выраженной стимуляции экспрессии остеогенных маркеров BMP2 и RUNX2 и безопасностью, которая обеспечивается полным удалением иммуногенных компонентов, а также отсутствием цитотоксичности, что минимизирует риск отторжения и нежелательных реакций.

2. Оригинальный лиофилизированный костнопластический материал при имплантации в асептический дефект в эксперименте на кроликах обеспечил восстановление целостности кости через этап ремоделирования с формированием функционально зрелой костной структуры, в отличие от свежемороженой аллокости разработанный материал не вызывал инкапсуляции и других патологических реакций в окружающих тканях, что подтверждает его биосовместимость, а также остеокондуктивные и остеоиндуктивные свойства.

3. Наиболее значимым параметром, определяющим эффективность насыщения оригинального остеопластического материала ванкомицином было давление ($F=19,99$, $p < 0,0001$), импрегнация антибиотиком костного материала в условиях вакуума (7-10 hPa) в 50% растворе этанола с 5% поливинилпирролидоном в течение 60 минут обеспечила антимикробную активность против MRSA в течение 14 дней с суммарным выходом антибиотика в 23 раза превышающим базовую методику ($p < 0,05$).

4. На модели одноэтапного лечения локализованного хронического остеомиелита у кроликов импрегнированный ванкомицином оригинальный остеопластический материал продемонстрировал сопоставимую с коммерческим биокompозитным материалом на основе β -ТКФ/ГА эффективность купирования инфекции и динамику репаративных процессов: снижение относительной площади воспаления с 78,19% до 32,65% ($R^2=0,993$ – сильная связь) и нарастание остеобластической активности с 3,99% до 11,37% ($R^2=0,978$) к 90-м суткам, при отсутствии перифокальных патологических реакций, что позволило провести клиническую апробацию на ограниченной группе пациентов.

5. Применение на реконструктивном этапе хирургического лечения пациентов с хроническим остеомиелитом оригинального остеопластического материала, импрегнированного ванкомицином, в сравнении с коммерческим биокompозитным материалом на основе β -ТКФ/ГА, позволило заместить костные дефекты значимо большего объема ($p = 0,002$), сократив при этом время операции ($p = 0,002$), при сопоставимой эффективности купирования инфекционного процесса: соответственно 96 и 92% ($p = 1,000$), что свидетельствует о перспективности данной разработки для последующей регистрации и клинического применения.

Практические рекомендации

1. На втором реконструктивном этапе двухэтапного лечения пациентов с хроническим остеомиелитом даже при отсутствии клинико-лабораторных признаков активного воспалительного процесса рекомендуется замещать

сформированный костный дефект остеопластическим биodeградируемым материалом с антимикробной активностью, в связи с высокой частотой выявления латентной инфекции (42% случаев).

2. При выполнении второго этапа двухэтапного лечения хронического остеомиелита рекомендуется выполнять микробиологическое исследование взятых интраоперационно тканевых биоптатов (3-5 образцов) для выявления латентно текущей инфекции, поскольку она увеличивает риск развития рецидива: частота рецидивов 14,3% против 0% при отрицательных посевах (ОР, с поправкой Халдейна–Анскомба) = 11,8 (95% ДИ 0,58–242; точный критерий Фишера $p = 0,062$).

3. Разработанный нами способ (RU 2722266 C1) можно рекомендовать для получения остеозамещающего лиофилизированного биodeградируемого костнопластического материала с трехмерной архитектоникой, улучшенными механическими свойствами, отсутствием цитотоксичности, остеоиндуктивной и остеокондуктивной активностью.

4. Для получения остеопластического пористого материала с пролонгированной антимикробной активностью в отношении грамположительных бактерий целесообразно использовать предложенный нами способ импрегнации (RU 2839413 C1), что обеспечивает эффективный выход ванкомицина из материала и создание локальных концентраций антибиотика, многократно превышающих МИК для резистентных штаммов.

5. При хирургическом лечении больных хроническим остеомиелитом костей верхних и нижних конечностей полостные дефекты объемом 15–55 мл целесообразно замещать лиофилизированным остеопластическим материалом на основе аллогенной кости с антимикробной активностью, что позволяет достичь длительной (более 2 лет) ремиссии в подавляющем большинстве случаев.

Основные печатные работы по теме диссертационного исследования

1. Сравнительный анализ эффективности костнопластических материалов, импрегнированных ванкомицином, при лечении хронического остеомиелита длинных костей / Антипов А.П., Божкова С.А., Гордина Е.М., Афанасьев А.В., Гаджимагомедов М.Ш. // Травматология и ортопедия России. - 2025. Т.31. № 2. С.33-44.

2. Экспериментальное изучение условий импрегнации для получения пролонгированной антимикробной активности оригинального остеопластического материала на основе губчатой аллокости / Антипов А.П., Божкова С.А., Гордина Е.М., Гаджимагомедов М.Ш., Кочиш А.А. // Гений ортопедии. – 2025. Т.31. №. 3. С.361-371.

3. Влияние метода обработки кости на ее прочность / Антипов А.П., Гордина Е.М., Марков М.А., Божкова С.А. // Гений ортопедии. – 2022. Т. 28. №. 6. С. 783-787.

4. Патент № 2722266 Российская Федерация, МПК А61К 35/32 (2015.01) А61F 2/28 (2006.01) А61L 27/54 (2006.01) А01N 1/02 (2006.01). Лиофилизированный биологический биodeградируемый минерализованный костнопластический материал и способ его изготовления : № 2019129034: заявлено 13.09.2019: опубликовано 28.05.2020/ Божкова С.А., Тихилов Р.М., Лабутин Д.В., Антипов А.П.; патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Р.Р. Вредена» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – 15 с.

5. Патент 2839413 Российская Федерация, МПК А61L 27/54 (2006.01) А61L 27/56 (2006.01) А61F 2/28 (2006.01) Способ импрегнации пористых материалов антибактериальными препаратами для одномоментного замещения остеомиелитических дефектов и создания депо антимикробных препаратов : № 2024132004: заявлено 24.10.2024: опубликовано 05.05.2025/ Божкова С.А., Антипов А.П., Тихилов Р.М., Гордина Е.М., Кочиш А.А., Афанасьев А.В., Нетылько Г.И.; патентообладатель: Федеральное

государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Р.Р. Вредена» Министерства здравоохранения Российской Федерации.