

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ ИМ. Р.Р. ВРЕДЕНА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Божкова Светлана Анатольевна

Санкт-Петербург

2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О ПРОБЛЕМЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОСТЕОЗАМЕЩАЮЩИХ МАТЕРИАЛОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ОСТЕОМИЕЛИТА (АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	16
1.1 Общая распространенность и региональные различия.....	17
1.2 Этиологический спектр и факторы риска развития хронического остеомиелита.....	18
1.3 Патогенез хронического остеомиелита: современные представления	21
1.3.1 Инициация инфекционного процесса	21
1.3.2 Формирование биопленки – как фактор хронизации инфекции	23
1.3.3 Механизмы хронизации остеомиелита	24
1.3.4 Деструкция кости и порочный круг патогенеза.....	25
1.4 Современные подходы к лечению хронического остеомиелита	26
1.4.1 Хирургическая санация	26
1.4.2 Этапность лечения хронического остеомиелита	27
1.4.3 Локальная антибиотикотерапия и эволюция остеозамещающих материалов	28
1.5 Технологии изготовления и импрегнации остеопластического материала на основе аллокости	32
1.5.1 Методы импрегнации аллокости антибактериальными препаратами	33
1.5.2 Преимущества и фармакокинетические особенности импрегнированных аллотрансплантатов.....	34
1.6 Резюме	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	37
2.1 Материалы экспериментальной <i>in vitro</i> части исследования	37
2.1.1 Аллогенный материал на основе головок бедренной кости	37
2.1.2 Материал для оценки влияния различных вариантов обработки на прочностные характеристики кости.	40

2.2 Методы экспериментальной <i>in vitro</i> части исследования	42
2.2.1 Очистка аллогенного костного материала	42
2.2.2 Морфолого-элементный анализ	44
2.2.3 Оценка влияния метода обработки кости на ее прочность	45
2.2.4 Получение ММСК для оценки цитосовместимости очищенного остеозамещающего материала	45
2.2.5 Оценка цитосовместимости очищенного остеозамещающего материала	46
2.2.6 Импрегнация костного материала антибиотиком (ванкомицин)	48
2.2.7 Стерилизация очищенного и импрегнированного материала	49
2.2.8 Оценка антимикробной активности образцов разрабатываемого остеопластического материала	50
2.2.9 Оценка стабильности антимикробной активности при длительном хранении	51
2.2.10 Исследование элюции антибиотика (ванкомицин) из полученного материала	51
2.2.11 Оценка стерильности материала и условий хранения	52
2.3 Материалы <i>in vivo</i> методов исследования	53
2.3.1 Экспериментальные животные и условия проведения исследований <i>in vivo</i>	53
2.4 Экспериментальные <i>in vivo</i> методы исследований	54
2.4.1 Периоперационное ведение экспериментальных животных	55
2.4.2 Применение оригинального остеозамещающего материала в условиях асептического дефекта у кроликов	56
2.4.3 Применение оригинального остеозамещающего материала с антимикробной активностью в условиях остеомиелитического дефекта у кроликов	57
2.4.4 Гистологическое исследование	58
2.4.5 Микробиологическое исследование	59
2.4.6 Лучевые исследования	60

2.5 Материалы клинической части исследования.....	61
2.5.1 Общая характеристика пациентов, включенных в исследование	61
2.6 Методы клинической части исследования.....	65
2.6.1 Выполнение хирургического вмешательства	65
2.6.2 Клинико-лабораторные методы исследования.....	67
2.6.3 Микробиологические методы исследования.....	68
2.6.4 Критерии эффективности лечения	68
2.6.5 Определение локальной концентрации ванкомицина	69
2.6.6 Лучевые методы исследования	69
2.7 Статистическая обработка данных экспериментальной и клинической частей исследования.....	70
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	
СВОЙСТВ ОРИГИНАЛЬНОГО ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА	73
3.1 Разработка и физико-химические характеристики оригинального остеопластического материала	73
3.1.1 Способ получения лиофилизированного остеопластического материала	73
3.1.2 Оценка морфологии поверхности материала методом сканирующей электронной микроскопии.....	78
3.1.3 Оценка элементного состава материала методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии.....	79
3.1.4 Оценка стерильности и стабильности материала при хранении	80
3.2 Оценка биомеханических свойств разработанного остеопластического материала.....	80
3.3 Оценка биологических характеристик материала в экспериментах <i>in vitro</i> .	82
3.3.1 Цитосовместимость материала.....	82
3.3.2 Остеоиндуктивный потенциал материала	82
3.3.3 Сравнительная оценка перифокальных тканевых реакций в эксперименте <i>in vivo</i>	83
3.3.3.1 Результаты гистологического исследования.....	84

3.3.3.2 Результаты рентгенологического исследования.....	85
3.4 Резюме	87
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА СПОСОБА ИМПРЕГНАЦИИ И ОСОБЕННОСТИ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ РАЗРАБОТАННОГО ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА С АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ	88
4.1 Сравнительный анализ эффективности различных методик импрегнации костного материала антибиотиком	88
4.2 Фармакокинетические характеристики высвобождения ванкомицина из образцов оригинального костнопластического материала	91
4.3 Стабильность антимикробных свойств и стерильности разрабатываемого материала при длительном хранении	96
4.4 Сравнительная оценка эффективности остеопластических материалов в условиях хронического остеомиелита	97
4.4.1 Результаты микробиологического исследования	97
4.4.2 Результаты гистологического и морфометрического анализа	98
4.5 Резюме	101
ГЛАВА 5. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИМПРЕГНИРОВАННЫХ ВАНКОМИЦИНОМ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ.....	103
5.1 Интра- и послеоперационные показатели второго этапа лечения	104
5.2 Концентрация ванкомицина в дренажном отделяемом	108
5.3 Результаты МБИ и клинические исходы.....	109
5.4 Результаты МСКТ исследования при контрольном осмотре	112
5.5 Резюме.	121
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	123
ВЫВОДЫ	129
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	131
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	133
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	138

ВВЕДЕНИЕ

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 остеокондуктивными 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 импрегнации 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. Биodeградируемые 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 биокompозитным 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 биокompозитным 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 остеоинтеграцию 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 остеиндуктивным 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 биокomпозитным 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.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О ПРОБЛЕМЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОСТЕОЗАМЕЩАЮЩИХ МАТЕРИАЛОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ОСТЕОМИЕЛИТА (АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Хронический остеомиелит (ОМ) представляет собой одну из наиболее сложных и до конца не решенных проблем современной гнойной хирургии и ортопедии [13, 55, 106]. Данное заболевание, характеризующееся инфекционным воспалением костной ткани с прогрессирующей деструкцией и формированием очагов некроза, вовлечением в патологический процесс надкостницы и окружающих мягких тканей, сопряжено с длительными сроками лечения, высокой частотой рецидивов (20-35%), значительным снижением качества жизни пациентов и колоссальной социально-экономической нагрузкой [3, 6, 11, 32, 59, 86, 152]. Стоимость лечения одного пациента может быть больше 100 000 долларов США, а риск суицида среди таких больных почти вдвое превышает популяционный [70, 114]. Учитывая, что рецидив хронического инфекционного процесса может развиваться даже спустя 50-80 лет после кажущегося излечения, использование термина «выздоровление» в контексте хронического остеомиелита считается некорректным [32].

Согласно современным представлениям, ОМ развивается в результате неэффективного лечения острой (гематогенной) инфекции или как осложнение травм, хирургических вмешательств и системных заболеваний, таких как сахарный диабет. В последние годы внимание исследователей сосредоточено на углубленном изучении этиопатогенеза, совершенствовании методов диагностики и лечения хронического остеомиелита. В частности, подчеркивается роль локальной антибиотикотерапии, которая позволяет достигать высоких концентраций препаратов в очаге инфекции, минимизируя риск развития системных побочных эффектов [33, 75, 92].

1.1 Общая распространенность и региональные различия

Распространенность хронического остеомиелита демонстрирует значительную вариабельность в зависимости от географического региона, уровня экономического развития страны и доступности медицинской помощи и составляет, в среднем, от 2 до 10 случаев на 100 000 населения. В экономически развитых странах основной причиной развития хронического остеомиелита являются инфекции, ассоциированные с ортопедическими имплантатами [93], в то время как в развивающихся регионах основными этиологическими факторами являются травматизация и инфицирование мягких тканей, при этом заболеваемость ОМ составляет до 15 случаев на 100 000 населения [32, 45, 103]. Такие различия обусловлены особенностями оказания медицинской помощи, доступностью антибактериальных препаратов и уровнем травматизма в различных регионах. По данным отечественных исследований, в Российской Федерации заболеваемость остеомиелитом составляет 3-8 случаев на 100 000 человек. Отмечаются региональные особенности распределения заболевания с пиками в промышленных регионах и среди пожилого населения [8, 15].

Наряду с географическими различиями, в последние десятилетия отмечается и выраженная динамика эпидемиологических показателей во времени. Показательно, что даже в развитых странах наблюдается тенденция к росту заболеваемости: например, в Японии данный показатель вырос с 5,3 до 7,4 на 100 000 населения в период с 2007 по 2010 годы, а в Дании — с 2,2 до 5,8 за 1995–2008 годы [18, 71, 80]. Авторы связывают это с улучшением качества диагностики, а также с увеличением числа пациентов с иммунодефицитными состояниями и ростом продолжительности жизни. Подтверждением этой тенденции служат данные крупного популяционного исследования, которое показало рост общей заболеваемости с 11,4 до 24,4 на 100 000 человеко-лет за 40-летний период (1969–2009 гг.), что, вероятно, обусловлено старением населения и увеличением числа хирургических вмешательств [83].

Особого внимания заслуживает эпидемиология остеомиелита в педиатрической практике, поскольку отсроченная манифестация инфекции может наблюдаться даже спустя десятилетия. Анализ тенденций последних лет выявляет на первый взгляд противоречивые данные. С одной стороны, некоторые исследования указывают на снижение числа случаев острого гематогенного остеомиелита, что напрямую связано с успехами программ вакцинации против *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* [79, 97, 117]. Также в ряде регионов отмечается снижение доли инфекций, ассоциированных с метициллин-резистентным *Staphylococcus aureus* (MRSA) [73, 140, 151, 156]. В то же время, общая доля наиболее устойчивых к лечению форм ОМ, вызванных полирезистентными микроорганизмами, остается стабильно высокой или возрастает, составляя около 15–17% [35, 52, 78].

Статистические данные о последствиях заболевания подчеркивают его тяжесть: общая летальность варьирует от 0,2% до 2,8%, однако в случаях, вызванных возбудителями с множественной лекарственной устойчивостью, этот показатель может достигать 20-27,1% [18, 48, 71, 98]. Это свидетельствует о том, что рост антибиотикорезистентности является ключевым фактором, определяющим неблагоприятный прогноз при данном заболевании.

1.2 Этиологический спектр и факторы риска развития хронического остеомиелита

Этиология хронического остеомиелита представляет собой сложную и динамичную картину, ключевым элементом которой является микробный возбудитель. Несмотря на многообразие патогенов, способных вызывать и поддерживать гнойно-некротический процесс в костной ткани, данные многочисленных исследований указывают на *Staphylococcus aureus* как на доминирующий этиологический агент [93, 148, 153, 154]. Однако его доля в структуре возбудителей варьирует в чрезвычайно широких пределах — от 20,5% до

96,15%, что, по-видимому, обусловлено различиями в дизайне исследований, географическом регионе, локализации процесса и контингенте пациентов [35, 175]. Так, схожие результаты при исследовании спектра возбудителей обнаруживаются при сравнении британских и российских исследований, где частота *S. aureus* составляет около 31–37% [9, 52], тогда как коллеги из Китая описывают рост доли этого микроба до 96,15% [175].

В последние годы отмечается неуклонный рост значимости коагулазонегативных стафилококков (CoNS), в частности *S. epidermidis*, которые ранее в большинстве случаев считали контаминантами [25, 112]. В научной литературе описывают почти шестикратное увеличение удельного веса CoNS (кроме *S. epidermidis*) за десятилетие, с 2,2% до 12,1% [9], что может быть связано с улучшением микробиологической диагностики. По данным немецкого регистра, CoNS занимают до 44,9% в структуре персистирующей костной инфекции, особенно ассоциированной с имплантатами [51]. в CoNS, как и *S. aureus* являются активными биопленкообразователями [113], что способствует хронизации инфекционного процесса [17].

Наряду с грамположительными кокками, существенную роль в этиологии хронического остеомиелита играют грамотрицательные микроорганизмы, особенно при посттравматических и нозокомиальных инфекциях [52, 105]. В их спектре чаще фигурируют *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* и *Enterobacter cloacae* [16, 150]. Некоторые исследования демонстрируют преобладание грамотрицательных микроорганизмов над грамположительными у пациентов с открытыми переломами или при длительном нахождении в стационаре [150], что противоречит большинству данных, указывающих на доминирование стафилококков [16, 175].

Особую проблему представляет растущая антибиотикорезистентность возбудителей, что напрямую влияет на выбор терапевтической тактики. Ключевым маркером является метициллинрезистентность у стафилококков (MRSA, MRSE). Распространенность MRSA демонстрирует значительные географические и временные колебания. Так, в Великобритании отмечено снижение его доли с 30,8%

до 11,4% [52], тогда как в Китае зафиксирован активный рост с 24,2% до 76,0% за 15 лет [175]. В США и Аргентине доля MRSA в структуре стафилококковых остеомиелитов в среднем может достигать 45–63% [27, 128]. Важно отметить, что изменение частоты встречаемости MRSA не эквивалентно общему изменению резистентности, так как пул инфекций, вызванных полирезистентными (MDR) штаммами, может оставаться стабильным за счет роста доли резистентных грамотрицательных бактерий и MRSE [52].

Высокая распространённость метициллин-резистентных стафилококков привела к тому, что β -лактамы антибиотики, ранее считавшиеся препаратами первого ряда для эмпирической терапии стафилококковых инфекций, часто оказываются неэффективными [27]. Это обстоятельство выдвигает на передний план гликопептиды, и, в частности, ванкомицин, как основной препарат для системной и локальной терапии остеомиелита стафилококковой этиологии. Исследования показывают сохранение активности ванкомицина у подавляющего большинства штаммов стафилококков, включая MRSA и MRSE [120, 130, 148]. Локальное применение ванкомицина в составе цементных спейсеров или биodeградируемых носителей позволяет создавать высокие концентрации антибиотика непосредственно в очаге инфекции, преодолевая барьеры, создаваемые биопленкой и нарушенным кровоснабжением [19, 22, 93, 161]. Тем не менее, появление штаммов с пониженной чувствительностью к ванкомицину (VISA) диктует необходимость постоянного микробиологического мониторинга и поиска новых терапевтических подходов [39, 69, 130].

Этиологический спектр хронического остеомиелита неразрывно связан с предрасполагающими факторами, которые зачастую и определяют как путь проникновения инфекции, так и видовой состав микрофлоры. Установлено, что наличие имплантированных металлоконструкций является одним из ключевых факторов риска, увеличивая вероятность развития инфекции, вызванной полирезистентными (MDR) штаммами, в пять раз [52]. Именно с имплантат-ассоциированными инфекциями связывают растущую роль коагулазонегативных стафилококков [177, 178]. Тяжелые инфицированные открытые переломы,

особенно костей голени, также представляют собой высокий риск, при котором частота инфекционных осложнений может достигать 30% [99, 100].

Вместе с тем, системные факторы, такие как сахарный диабет, ожирение и иммуносупрессивные состояния, употребление наркотически препаратов значительно повышают риск развития ОМ [60, 93, 101, 104]. Показано, что *S. aureus* способен адаптироваться к метаболическим особенностям диабетической среды, что облегчает его персистенцию [57].

1.3 Патогенез хронического остеомиелита: современные представления

Хронический остеомиелит характеризуется персистирующим воспалительным процессом в костной ткани, который приводит к ее прогрессирующей деструкции, формированию некротических участков (секвестров) и, часто, сопровождается образованием свищевых ходов [78, 136, 148]. Ключевыми особенностями патогенеза, определяющими трудности в лечении и склонность к рецидивированию, являются способность микроорганизмов формировать защитные биопленки, их инвазия в клеточные структуры кости и сложный, нередко деструктивный, ответ иммунной системы хозяина [129, 168]. Понимание этих многогранных механизмов является фундаментальной основой для разработки новых терапевтических стратегий, в том числе создания остеопластических материалов с антимикробной активностью.

1.3.1 Инициация инфекционного процесса

Развитие остеомиелита начинается с проникновения патогенов в костную ткань. Это может происходить экзогенным путем, например, при открытых переломах, где происходит прямая контаминация раны микроорганизмами, или в ходе хирургического лечения, сопровождающегося установкой ортопедических

конструкций [29, 65, 145]. Эндогенный, или гематогенный, путь также является одним из вариантов проникновения микроорганизмов в ткани, особенно при бактериемии различного генеза [129]. Для высокоэнергетической травмы характерно массивное повреждение мягких тканей и кости, с формированием деваскуляризированных участков, что служит благоприятной средой для микробной колонизации [53].

При имплантат-ассоциированных инфекциях патогенез часто описывается концепцией «гонки за поверхность» [64]. Сразу после установки ортопедической конструкции её поверхность покрывается слоем белков внеклеточного матрикса хозяина: фибронектина, фибриногена, витронектина и других [159], который становится мишенью не только для клеток макроорганизма, но и для конкурирующих с ними за поверхность для адгезии бактерий.

Первичное прикрепление бактерий к поверхности является обратимым и опосредуется неспецифическими физико-химическими силами (гидрофобными, электростатическими) [20, 36]. Переход к необратимой адгезии осуществляется посредством специфического взаимодействия бактериальных поверхностных белков, известных как MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules - микробные поверхностные компоненты, распознающие адгезивные матриксные молекулы), с белками внеклеточного матрикса на поверхности имплантата или участках некротизированной ткани [113, 115]. У *Staphylococcus aureus*, основного возбудителя остеомиелита [93], ключевую роль в этом процессе играют фибронектин-связывающие белки (FnBPA и FnBPB), коллаген-связывающий белок (Cna), а также факторы слипания (ClfA, ClfB), которые связываются с фибриногеном и выявляются в изолятах из остеомиелитических очагов [76, 78, 88, 149].

1.3.2 Формирование биопленки – как фактор хронизации инфекции

После успешной адгезии бактерии начинают активно размножаться и формировать биопленку – структурированное сообщество микроорганизмов, заключенных во внеклеточный полимерный матрикс (EPS – extracellular polymeric substance), который они сами и продуцируют [66, 157]. Этот матрикс, состоящий из полисахаридов, белков, липидов и внеклеточной ДНК (eDNA), обеспечивает структурную целостность биопленки и служит первой линией защиты бактерий от антибиотиков и иммунной системы макроорганизма [168]. Формирование биопленки является ключевым фактором, обуславливающим переход инфекции в хроническую, трудноизлечимую форму [30, 177].

По мере созревания биопленка приобретает сложную трехмерную структуру с водными каналами, обеспечивающими циркуляцию питательных веществ и сигнальных молекул [139, 141, 142]. Зрелая биопленка представляет собой гетерогенную среду. Внутри нее создается градиент концентрации кислорода и питательных веществ, что приводит к формированию субпопуляций бактерий с различной метаболической активностью [126, 139]. В глубоких, анаэробных слоях биопленки бактерии переходят в метаболически неактивное, или дремлющее, состояние. Эти клетки, называемые персистерами, вносят основной вклад в феномен толерантности к антибиотикам, поскольку большинство антибактериальных препаратов действуют на активно делящиеся клетки. Известно, что концентрации антибиотиков, необходимые для эрадикации бактерий в биопленке, могут в 100-1000 раз превышать минимальные ингибирующие концентрации (МИК) для их планктонных (свободноживущих) форм [110, 133].

1.3.3 Механизмы хронизации остеомиелита

Помимо физической защиты, обеспечиваемой матриксом, бактерии в биопленках используют множество активных механизмов для уклонения от иммунной системы. Фагоциты, такие как макрофаги и нейтрофилы, не способны эффективно уничтожить организованную биопленку, что приводит к явлению «фрустрированного фагоцитоза», при котором фагоциты высвобождают литические ферменты во внешнюю среду, повреждая окружающие ткани хозяина, но не саму биопленку [129]. Более того, *S. aureus* может продуцировать цитотоксины (например, α -токсин, лейкоцидины), которые вызывают гибель иммунных клеток [132, 138].

Особый интерес представляет способность *S. aureus* к внутриклеточной персистенции. Бактерии могут проникать и выживать внутри эукариотических клеток, в том числе в остеобластах, остеоцитах и даже остеокластах [82, 121, 122, 170]. Внутриклеточная локализация защищает патоген от антибиотиков, которые плохо проникают через клеточную мембрану, и от факторов иммунной системы макроорганизма. Внутриклеточная среда также способствует формированию фенотипических вариантов бактерий, характеризующихся замедленным ростом колонии, сниженным метаболизмом, низкой вирулентностью, но повышенной способностью к персистенции и устойчивостью к антибиотикам [121, 122]. Именно с фенотипом малых колоний (small colony variants – SCV) и с внутриклеточными резервуарами связывают рецидивы остеомиелита на поздних сроках после кажущегося излечения – через месяцы и даже годы [122].

Кроме того, известен еще один механизм персистенции – инвазия *S. aureus* в остеоцитарную лакунарно-канальцевую сеть (OLCN) с поражением остеоцитов [46, 47]. В остеоцитарных лакунах бактериальные клетки могут выживать длительное время, используя деминерализованный коллаген в качестве источника питательных веществ и распространяясь по сети канальцев к соседним остеоцитам [104, 129]. Этот механизм, по-видимому, является одним из ключевых для

поддержания глубокой хронической костной инфекции и обуславливает рецидивирование инфекционного процесса, спустя длительные сроки после проведенного хирургического лечения.

1.3.4 Деструкция кости и порочный круг патогенеза

Присутствие бактерий и их продуктов (пептидогликан, липотейхоевые кислоты, токсины) запускает мощный воспалительный ответ. Иммунные клетки, инфильтрирующие очаг инфекции, высвобождают большое количество провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли- α (TNF- α), интерлейкин-1 (IL-1) и интерлейкин-6 (IL-6) [166, 168]. Эти медиаторы, с одной стороны, направлены на борьбу с инфекцией, но с другой – губительно действуют на саму костную ткань. Они нарушают хрупкий баланс костного ремоделирования, подавляя активность остеобластов и активируя остеокласты [58]. Этот дисбаланс усугубляется прямым воздействием бактериальных факторов. Например, белок A (SpA) *S. aureus* может напрямую взаимодействовать с остеобластами, индуцируя их апоптоз и стимулируя выработку лиганда RANKL, который является ключевым активатором остеокластов [28, 38, 158]. Хроническое воспаление на фоне бактериальной инвазии приводит к стимуляции остеолiza.

Воспалительный отек и абсцессы, формирующиеся в окружающих кость тканях, сдавливают сосуды, нарушая кровоснабжение кости [108]. Развивающаяся ишемия приводит к некрозу костной ткани и образованию секвестров. Секвестры, будучи мертвой тканью, лишенной кровоснабжения недоступны для системных антибиотиков и иммунных клеток и являются идеальным субстратом для дальнейшей колонизации бактериями и формирования биопленок [86]. В итоге, замыкается порочный круг: инфекция вызывает воспаление и некроз, а некротизированная ткань поддерживает персистенцию инфекции.

Таким образом, проведенный анализ механизмов патогенеза неизбежно приводит к выводу о фундаментальных причинах низкой эффективности

системной антибактериальной терапии при лечении хронического остеомиелита. Формирование защитного матрикса биопленок, наличие метаболически неактивных персистеров и внутриклеточных форм бактерий, а также нарушение локального кровоснабжения с образованием аваскулярных секвестров создают практически непреодолимые барьеры для проникновения и действенности антибиотиков при их системном введении [58].

1.4 Современные подходы к лечению хронического остеомиелита

Исходя из особенностей патогенеза важнейшим условием для успешного лечения пациентов с ОМ становится радикальная хирургическая обработка, направленная на иссечение всех нежизнеспособных тканей, секвестров и удаление инфицированных имплантатов. Однако, поскольку даже самая тщательная санация не может гарантировать полную эрадикацию микроорганизмов, ключевое значение приобретает локальная антибактериальная терапия. Создание в костном дефекте высоких, многократно превышающих системно достижимые, концентраций антибактериального препарата способно преодолеть толерантность бактерий в остаточных микроочагах персистенции — костномозговых микроабсцессах и лакуно-канальцевой сети компактной кости (каналы Гаверса и Фолькмана; lacuno-canalicular network, OLCN), а также в биопленках, обеспечивая полноценную эрадикацию возбудителей и формируя условия для последующей репаративной регенерации [93].

1.4.1 Хирургическая санация

Основой лечения ОМ является радикальная хирургическая обработка (дебридмент) инфекционного очага [119, 143, 155]. Цель вмешательства — полное удаление гнойно-некротических масс, секвестров, инфицированных имплантатов и

биофленок, являющихся депо персистирующих возбудителей [7, 173]. Показательным в этом отношении является исследование Simpson A.H. et al. (2001), в котором была продемонстрирована прямая зависимость частоты рецидивов от объема резецируемой кости. Было установлено, что радикальный дебридмент с иссечением кости на >5 мм в пределах здоровых тканей (от видимой границы некроза) позволил достичь эрадикации инфекции у 100% пациентов, против 72% при резекции кости <5 мм [135]. Недостаточная санация признается главной причиной неудач лечения в 84% случаев [3].

Радикальная санация неизбежно приводит к формированию костного дефекта, так называемого «мертвого пространства» (dead space), замещение (пластика) которого становится вторым, критически важным этапом хирургического лечения [1]. Сохранение такого дефекта создает условия для формирования гематомы, служащей питательной средой для микроорганизмов и ведущей к рецидиву инфекции [107, 119, 155]. Необходимость сочетания радикальной санации с последующей пластикой полостного костного дефекта, без нарушения стабильности сегмента, создает высокий риск инфицирования остеопластического материала, имплантируемого в потенциально контаминированную рану. Это обстоятельство привело к формированию двух основных хирургических подходов: двухэтапная санация – основанная на разделении этапов РХО и реконструкции кости для снижения инфекционных рисков и одноэтапная - предполагающая одномоментное решение обеих задач, что стало возможным благодаря внедрению в практику материалов с антимикробными свойствами и развитию микрохирургических техник.

1.4.2 Этапность лечения хронического остеомиелита

Исторически доминирующим было двухэтапное лечение ОМ, канонически описанное в классических работах зарубежной [91] и отечественной [14] школ костно-гнойной хирургии, где на первом этапе после санации дефект заполняется

временным спейсером из полиметилметакрилата (ПММА), импрегнированного антибиотиками (чаще всего аминогликозидами и ванкомицином ввиду их термостабильности) [22, 96]. Это позволяет достичь эффективных локальных концентраций антибиотика и предотвратить заполнение полости гематомой и рубцом для последующей пластики. Второй этап, заключающийся в удалении спейсера и замещении дефекта, выполняется на сроках от 3 до 6 недель [77, 95].

Вместе с тем, двухэтапная методика сопряжена с необходимостью выполнения повторного хирургического вмешательства, увеличением риска анестезиологических осложнений и значительным ростом продолжительности и стоимости лечения. Так, по данным [176], средняя длительность госпитализации при двухэтапном лечении составила 28 дней против 18 дней при одноэтапном. Эти данные подтверждаются и другими авторами, указывающими на сроки госпитализации в 22-27 дней [85, 147]. Это обстоятельство послужило мощным стимулом для развития одноэтапных методик, при которых санация и окончательное замещение, дефекта выполняются одномоментно.

Результаты масштабного мета-анализа [85], охватившего 42 исследования и 1605 пациентов, показали, что статистически значимых различий в частоте излечения между одноэтапным и двухэтапным подходами нет, а частота осложнений также была сопоставима (26,6% для одноэтапного и 27,6% для двухэтапного лечения). Эти данные позволяют утверждать, что при наличии соответствующих материалов и условий одноэтапная хирургия является не менее эффективной и при этом более экономически выгодной стратегией.

1.4.3 Локальная антибиотикотерапия и эволюция остеозамещающих материалов

Ключевым фактором, сделавшим возможным успех одноэтапных хирургических вмешательств при хроническом остеомиелите, стало появление биорезорбируемых носителей антибиотиков, способных одновременно выполнять

и функцию остеопластического материала. В отличие от системной антибактериальной терапии, эффективность которой при данном заболевании существенно ограничена из-за нарушения микроциркуляции и формирования аваскулярных зон в очаге инфекции [58, 86], локальная доставка препаратов обеспечивает создание высоких бактерицидных концентраций непосредственно в месте инфекционного процесса. Такой подход позволяет минимизировать системную токсичность и преодолеть барьер, создаваемый бактериальными биопленками [19, 94].

Исторически «золотым стандартом» для локальной доставки антибиотиков, особенно в рамках двухэтапной тактики лечения, является полиметилметакрилат (ПММА) [23, 84]. Его популярность обусловлена высокой механической прочностью и многолетним опытом применения, демонстрирующим эффективность в эрадикации инфекции свыше 90%. Однако ПММА присущ ряд серьезных недостатков. Во-первых, он является небиodeградируемым материалом, что требует повторной операции для его удаления. Во-вторых, его фармакокинетический профиль далек от идеального: для него характерен резкий начальный выброс антибиотика в первые 24-72 часа, после которого концентрация стремительно падает, при этом общее высвобождение составляет менее 10% от загруженной дозы [23, 81]. Кроме того, механические свойства ПММА находятся в обратной зависимости от концентрации добавляемого антибиотика, что создаёт клиническую дилемму выбора между антибактериальной эффективностью и механической стабильностью [4, 81]. В качестве альтернативного небиodeградируемого материала с высокой прочностью рассматривается полиэфирэфиркетон (ПЭЭК), из которого возможно создание пористых имплантатов сложной формы, однако он также требует удаления и является биоинертным [37, 111].

В ответ на ограничения, присущие нерезорбируемым полимерам, научный поиск был направлен на разработку биodeградируемых материалов на основе солей кальция. Сульфат кальция (СК) является полностью биорезорбируемым материалом с предсказуемой кинетикой элюции, обеспечивающим поддержание

высоких локальных концентраций антибиотиков в течение 4-6 недель [95]. Клинические исследования показывают высокую эффективность его применения с результатами выздоровления около 85-94% [74, 96]. Тем не менее, к его недостаткам относят высокую частоту длительного асептического раневого отделяемого и недостаточную механическую прочность для нагружаемых зон [56, 74].

Более сбалансированными свойствами обладает керамика на основе фосфатов кальция (ФК). Такие материалы, как β -трикальцийфосфат (β -ТКФ) и гидроксиапатит (ГА), отличаются высокой биосовместимостью и остеокондуктивностью. Однако стандартные ФК-материалы демонстрируют нежелательное быстрое начальное высвобождение антибиотика — до 98% за первые 7 дней [89]. Было показано, что модификация структуры, например, путем добавления кремния (Si), позволяет значительно замедлить и пролонгировать процесс элюции. Композиты на основе гидроксиапатита и коллагена (ГА/К) также демонстрируют способность удерживать эффективные концентрации гликопептидных антибиотиков до 14 дней, ускоряя при этом регенерацию кости [54].

Дальнейшее развитие систем локальной доставки связано с применением биodeградируемых полимеров, позволяющих создавать сложные архитектуры (микрочастицы, гидрогели) с программируемым высвобождением. Полимеры на основе поли-(молочной-ко-гликолевой кислоты) (ПЛГА) широко исследуются для инкапсуляции различных препаратов, однако для них также характерен начальный взрывной выброс и кислые продукты деградации, способные вызывать локальное воспаление [67, 171]. Инъекционные гидрогели на основе хитозана или гиалуроновой кислоты представляют особый интерес благодаря их способности полностью заполнять дефекты сложной формы и возможности создания «умных» систем, высвобождающих препарат в ответ на ферменты бактерий или изменение pH [144, 146]. Их главный недостаток — крайне низкая механическая прочность.

Современным подходом является создание композитных материалов, сочетающих преимущества разных классов. Так, комбинация хитозана и фосфата

кальция позволяет объединить остеокондуктивность керамики и контролируемое высвобождение, обеспечиваемое полимерной матрицей [125]. Другим примером являются покрытия для титановых имплантатов, которые несут основную механическую нагрузку, в то время как нанесенное на них полимерное или керамическое покрытие обеспечивает пролонгированную доставку антибиотика непосредственно в зоне остеоинтеграции [90, 174]. Полость такого каркаса может быть заполнена носителем антибиотика, например, гидрогелем, что позволяет сочетать механическую поддержку с локальной антибактериальной терапией [34, 87]. Сходными свойствами обладают и другие высокопрочные материалы, такие как пористый полиэфирэфиркетон (PEEK) с модулем сжатия 0.4-0.98 ГПа [124] и пористая керамика из оксида алюминия, которая также обеспечивает первичную стабильность и может быть изготовлена индивидуально под дефект пациента [118].

Наиболее перспективным с биологической точки зрения является использование костных трансплантатов в качестве носителей антибиотиков. Опыт онкоортопедии также показывает, что при больших дефектах аллотрансплантаты являются рабочей альтернативой аутокости с сопоставимыми отдалёнными результатами [1]. Аутологичная кость, будучи «золотым стандартом» остеопластики, при простом смешивании с порошком антибиотика демонстрирует неблагоприятную фармакокинетику с высвобождением основной массы препарата в первые 1-3 дня [161]. Это создает риск как локальной цитотоксичности, так и быстрой потери терапевтической концентрации [127]. Более технологичным представляется использование аллогенных костных трансплантатов, модифицированных специальными системами доставки. Исследования показывают, что импрегнация аллокости не простыми растворами, а биодеградируемыми депо-системами (например, на основе ПЛГА) или нанесение композитных покрытий (например, желатин/наногидроксиапатит) позволяет обеспечить контролируемое, близкое к кинетике нулевого порядка, высвобождение антибиотиков в течение нескольких недель, сочетая эрадикацию инфекции со стимуляцией полноценной костной регенерации [123, 169].

Таким образом, анализ современных систем локальной доставки антибиотиков выявляет очевидное противоречие: материалы с оптимальными фармакокинетическими характеристиками (полимеры, гидрогели) не обладают остеоиндуктивными свойствами и механической прочностью, в то время как биологически активные костные трансплантаты демонстрируют неудовлетворительный профиль высвобождения препаратов. Это определяет актуальность разработки технологии изготовления материала с уникальными биологическими свойствами при возможном обеспечении контролируемой пролонгированной элюции антимикробных препаратов.

В этом контексте, наиболее перспективным является использование в лечении пациентов с инфекционным поражением костей антимикробного остеопластического материала на основе очищенной аллокости, который будет характеризоваться стандартной, запрограммированной, продолжительностью элюции антибиотиков. Подобные материалы зарегистрированы для медицинского применения в странах ЕС, (прим. OSTEOmycin® Orthopaedic; AlloMatrix® - продукт компании WrightMedical)[161]. В Российской Федерации данный продукт не зарегистрирован и аналогов у него нет.

1.5 Технологии изготовления и импрегнации остеопластического материала на основе аллокости

Основополагающим этапом создания эффективного и безопасного носителя является предварительная обработка донорского костного материала. Основная цель данной обработки заключается в удалении клеточных элементов, костного мозга и жировой ткани для снижения иммуногенности трансплантата и увеличения его пористости, что облегчает последующую импрегнацию антибиотиком [43]. В современной практике применяются различные физические, химические и физико-химические методы очистки [5] и, отдельный вариант подготовки,

деминерализация, усиливающая остеоиндуктивность за счёт экспозиции матричных белков и BMP [10].

К химическим методам относится обработка перекисью водорода, спиртосодержащими смесями и ферментами, такими как трипсин или химотрипсин, для удаления белковых компонентов [5]. Так, в исследовании Coraça-Huber D.C. с соавторами (2012) был описан комплексный процесс, включающий ультразвуковую очистку, химическую обработку для денатурации белков, обработка перекисью и последующую лиофилизацию. В то же время, рядом авторов предложены методы, основанные на обработке сверхкритическим диоксидом углерода (CO_2), который в таком состоянии обладает свойствами газа и растворителя, обеспечивая глубокое проникновение и эффективное удаление липидов из структуры кости [161].

Заключительным этапом подготовки является стерилизация. Наиболее распространенным методом является гамма-облучение в дозе 25 кГр, однако установлено, что такая доза способна снижать механическую прочность кости до 20% [5, 164]. Это противоречие между необходимостью обеспечения стерильности уровня 10^{-6} и сохранением биомеханических свойств материала остается предметом исследований [5].

1.5.1 Методы импрегнации аллокости антибактериальными препаратами

Способ введения антибиотика в костную матрицу напрямую влияет на его последующую концентрацию и кинетику высвобождения. Наиболее простым и часто описываемым методом является пассивное погружение (вымачивание) костных блоков или чипсов в растворе антибиотика [24, 41]. Другой доступный для интраоперационного применения метод — это ручное смешивание измельченной губчатой кости с порошком антибиотика [42].

Тем не менее, для достижения максимально высоких локальных концентраций антибиотика были разработаны более сложные технологии. Н.

Winkler с соавторами описали специальные техники инкубации, позволяющие погружать до 5 г ванкомицина в 50 см³ костного трансплантата, что, по утверждению авторов, в 10 раз превышает возможности других методик [49, 161, 164]. В качестве перспективного метода рядом авторов изучен ионтофорез, который позволяет достичь более высоких концентраций элюции по сравнению с простым замачиванием аллокости [44, 102, 116]. Таким образом, выбор метода импрегнации представляет собой компромисс между технологической сложностью и эффективностью насыщения материала.

1.5.2 Преимущества и фармакокинетические особенности импрегнированных аллотрансплантатов

Ключевым преимуществом импрегнированных аллотрансплантатов является способность создавать чрезвычайно высокие локальные концентрации антибиотиков, многократно превышающие минимальные ингибирующие концентрации (МИК) для большинства возбудителей и недостижимые при системном введении. Исследования имплантатов из аллокости *in vitro* показали, что концентрации ванкомицина могут достигать 20 000-24 000 мкг/мл в первые сутки [26, 162]. Такая "взрывная" начальная элюция с последующим логарифмическим снижением в течение нескольких недель остается оптимальной для эрадикации биопленочных форм бактерий [172].

В качестве выбора исследователи отдают предпочтение губчатой костной ткани перед кортикальной, поскольку ее пористая структура обеспечивает большую площадь поверхности для адсорбции и последующего более эффективного высвобождения антибиотиков [24, 116]. При этом показано, что импрегнация антибиотиками, в частности ванкомицином, который признан одним из наименее цитотоксичных, не оказывает негативного влияния на процессы остеointеграции и биосовместимость материала [40, 116]. Гистологические

исследования подтверждают сопоставимое количество новообразованной костной ткани в группах с импрегнированными и чистыми трансплантатами [40].

Следует отметить, что фармакокинетические профили различных антибиотиков могут существенно отличаться. Так, в ряде работ установлено, что ванкомицин элюируется из костных трансплантатов значительно лучше, чем аминогликозиды, в отличие от костного цемента, где наблюдается обратная картина [24]. В то же время, в исследовании Winkler H. с соавторами (2003) было выявлено, что тобрамицин, хотя и показывал более низкие начальные концентрации, элюировался более стабильно и длительно по сравнению с ванкомицином. Эти данные указывают на необходимость тщательного подбора антибиотика в зависимости от клинической задачи и предполагаемого возбудителя.

1.6 Резюме

Таким образом, выполненный анализ научных публикаций позволяет заключить, что хронический остеомиелит остается одной из наиболее трудноразрешимых проблем современной ортопедии и гнойной хирургии. Фундаментальные механизмы его патогенеза, включающие формирование бактериальных биопленок, внутриклеточную персистенцию возбудителей и нарушение локального кровоснабжения с образованием аваскулярных секвестров, создают практически непреодолимые барьеры для системной антибактериальной терапии. Это обстоятельство неопровержимо доказывает, что ключевым условием успешного лечения помимо радикальной хирургической обработки является создание высоких концентраций антимикробных препаратов непосредственно в очаге инфекции.

Существующие системы локальной доставки на основе полимеров или солей кальция, несмотря на определенную эффективность, обладают рядом существенных недостатков, таких как отсутствие биodeградации, и остеогенного потенциала, низкая механическая прочность, а также неудовлетворительные

фармакокинетические профили. Это определяет острую клиническую потребность в разработке остеопластического биodeградируемого материала с пролонгированной антимикробной активностью, чему и будет посвящено данное исследование.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы экспериментальной *in vitro* части исследования

С целью разработки оптимального метода очистки и насыщения костного материала антибиотиком для создания остеозамещающего материала с антимикробной активностью использовали головки бедренных костей человека, полученные при первичном эндопротезировании тазобедренного сустава и прошедшие отбор по клиническим критериям и скрининг на гемотрансмиссивные инфекции. Для оценки влияния обработки на биомеханические свойства материала использовали стандартизированные образцы губчатой кости крупного рогатого скота.

2.1.1 Аллогенный материал на основе головок бедренной кости

Основой для разработки оригинального остеопластического материала были головки бедренных костей (ГБК), резецированные во время операции первичного эндопротезирования тазобедренного сустава в условиях операционных ФГБУ «НМИЦ ТО им. Р. Р. Вредена» Минздрава России. Критериями включения донорского материала были: подписание пациентом «Информированного добровольного согласия на забор фрагмента кости при проведении хирургического вмешательства», возраст от 18 до 75 лет, диагноз коксартроза I-III ст., асептического некроза головки бедренной кости. Критериями исключения служили: выраженные деформации головки бедренной кости с нарушением ее сферичности, наличие обширных кистозных полостей диаметром более 10 мм, разрушение и фрагментация головки при ее удалении, признаки воспалительных заболеваний суставов в анамнезе, системные заболевания соединительной ткани, метаболические остеопатии, онкологические заболевания любой локализации,

длительная терапия глюкокортикостероидами (более 3 месяцев), иммуносупрессивная терапия, наличие в анамнезе туберкулеза любой локализации.

При поступлении все потенциальные доноры проходили стандартное предоперационное обследование (согласно документу – «предоперационное обследование для «больших» операций» ФГБУ «НМИЦ ТО им. Р. Р. Вредена» Минздрава России), включавшее общий и биохимический анализы крови, коагулограмму, общий анализ мочи, а также обязательный скрининг на гемотрансмиссивные инфекции: антитела к вирусам иммунодефицита человека, поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg), антитела к вирусу гепатита С (anti-HCV), антитела к возбудителю сифилиса (суммарные антитела к *Treponema pallidum*). При получении отрицательных результатов первичного скрининга пациент допускался к операции.

После резекции в стерильных условиях операционной ГБК подвергались первичной механической обработке с удалением остатков мягких тканей. Очищенные ГБК помещали в трехслойную упаковку для транспортировки биологического материала 30×25 см из нетканых материалов, одноразового стерильного (с полем для записи, ООО ТД АгатМед, Россия) и маркировали с указанием индивидуального кода донора, который заносился в специальный журнал учета и регистрации биоматериала. Упакованный материал немедленно помещали в карантинную зону биобанка с температурой хранения -80°C (вертикальный низкотемпературный морозильник SANYO MDF-U5386S).

Температура хранения -80°C была выбрана как стандартная для длительного хранения биологических тканей, поскольку при данной температуре практически полностью останавливаются процессы ферментативной деградации белков, нуклеиновых кислот и других биологически активных молекул, что обеспечивает сохранение остеоиндуктивных и остеокондуктивных свойств костной ткани. Все этапы транспортировки и хранения материала документировались в журнале учета донорского костного материала и индивидуальных карточках донора в соответствии с требованиями Приказа Минздрава России от 08.06.2016 № 355н «Об утверждении порядка учета донорских органов и тканей человека, доноров органов

и тканей, пациентов (реципиентов), форм медицинской документации и формы статистической отчетности в целях осуществления учета донорских органов и тканей человека, доноров органов и тканей, пациентов (реципиентов) и порядка их заполнения». Карточка донора содержала демографические данные, диагноз, результаты первичного и повторного скрининга на инфекции, даты забора и перемещения материала между зонами хранения.

Период карантина продолжался до повторного исследования донора после оперативного лечения на гемотрансмиссивные инфекции. При получении отрицательных результатов всех контрольных тестов ГБК переводились из карантинной зоны в основное хранилище биобанка для дальнейшего использования в исследовании.

В случае выявления положительного результата на любой маркер инфекции при повторном обследовании, соответствующая ГБК немедленно изымалась из карантинного хранилища, помещалась в биологически опасные отходы класса В и подвергалась обеззараживанию путем автоклавирования при температуре 132°C и давлении 2 бар в течение 90 минут. Утилизация обеззараженного материала проводилась в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Следующим этапом подготовки остеопластического материала являлась механическая обработка головок бедренных костей, успешно прошедших период карантинизации. Работы проводили в асептических условиях ламинарного бокса. После размораживания с поверхности ГБК тщательно удаляли остатки суставного хряща, а также иссекали все визуально определяемые участки некротизированной или разрушенной костной ткани и кистозные полости. Подготовленная таким образом губчатая кость подвергалась распилу для получения стандартизированных костных блоков размером 5x5x5 мм, либо измельчалась до состояния костных чипсов и крошки.

2.1.2 Материал для оценки влияния различных вариантов обработки на прочностные характеристики кости.

Для получения достаточного количества стандартизированных образцов однородного по своим характеристикам нативного материала с целью оценки прочностных характеристик был использован срез метаэпифиза единого уровня одной большеберцовой кости крупного рогатого скота (рисунок 2.1.). Такой объект обеспечил большую сплошную площадь однородного губчатого вещества, что позволяло отобрать образцы одинаковой геометрии и ориентации из центральных и периферических зон одного спила. Подход минимизировал междонорную вариабельность костной ткани, обеспечил сопоставимость плотности и микроархитектуры образцов кости между экспериментальными группами и повысил воспроизводимость биомеханических испытаний.

Разметку среза губчатой кости выполняли для получения максимального числа однотипных образцов. Распил производили ручной пилой по нанесённой сетке с получением брусков заданных размеров ($7 \pm 1,5 \times 7 \pm 1,27 \times 10$ мм). Образцы распределяли по группам с равномерным представлением центральных и периферических зон. Образцы отбирали равномерно из центральных и периферических зон спила. Сформировали три группы: группа 1 – свежезамороженная нативная кость (n=8); группа 2 – кость, очищенная комбинированным химическим и физическим методом в соответствии с настоящим исследованием (n=13); группа 3 – кость, очищенная аналогичным способом с последующей лиофилизацией (n=11).

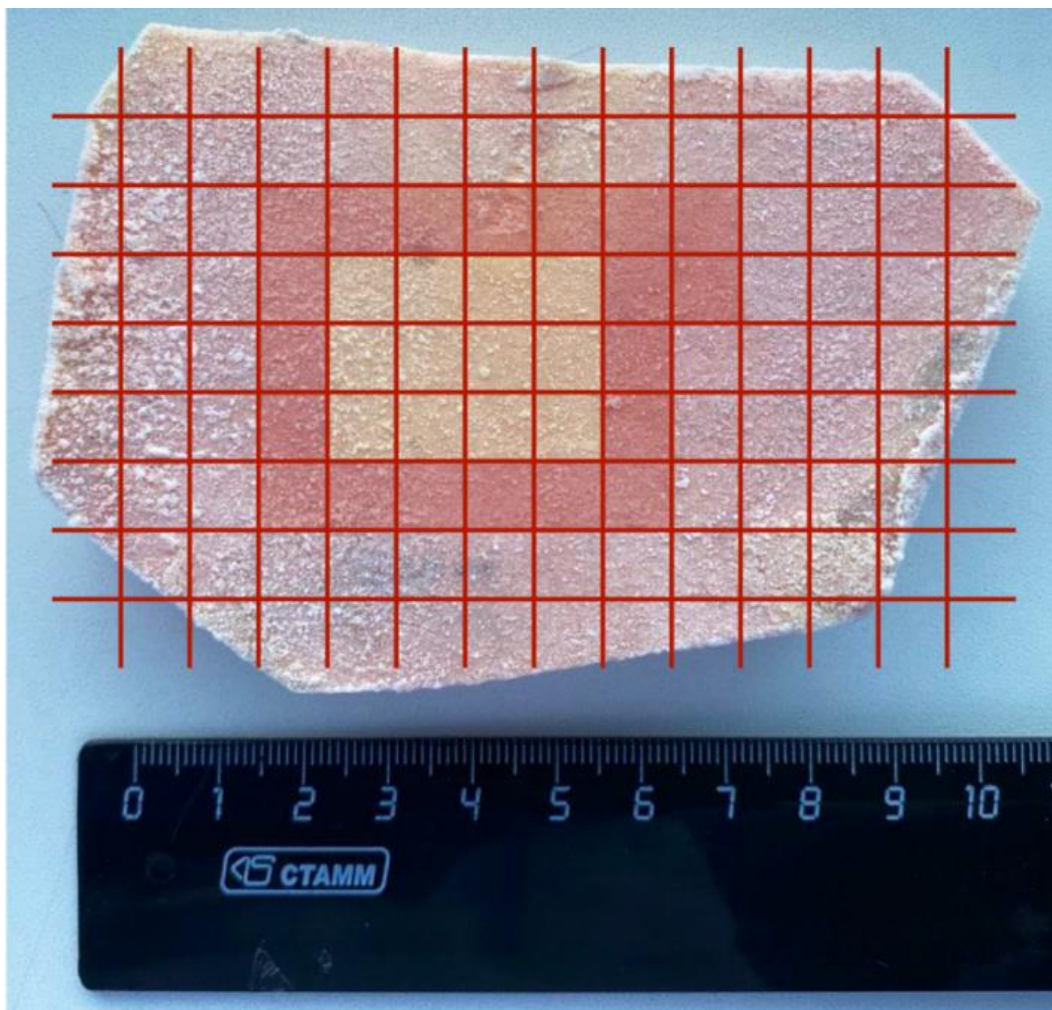


Рисунок 2.1 - Срез метаэпифиза большеберцовой кости крупного рогатого скота с удаленным кортикальным слоем, свежемороженый (цветом выделены зоны, из которых брали образцы для исследования)

Лиофилизацию проводили в сублимационной установке НЕТО PowerDry PL3000 (Дания) в течение 40 ч до достижения остаточной влажности менее 5% определяемой анализатором. Механические испытания выполняли на электромеханической универсальной испытательной машине 1958У-10-1 (Россия) на базе Санкт-Петербургского государственного технологического института.

2.2 Методы экспериментальной in vitro части исследования

Для создания остеопластического материала с антимикробной активностью была разработана многоэтапная технология обработки аллогенной костной ткани. Головки бедренных костей подвергали циклической физико-химической очистке с использованием комбинации растворов (перекись водорода, гидрокарбонат натрия, этанол) и физических воздействий (ультразвук, шейкерная баня, центрифугирование) для получения очищенного минерально-коллагенового матрикса. Качество очистки контролировали методами сканирующей электронной микроскопии и энергодисперсионной спектроскопии, а влияние обработки на биомеханические свойства оценивали в испытаниях на одноосное сжатие. Биосовместимость материала подтверждали культивированием мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток с оценкой их жизнеспособности и остеогенной дифференцировки. Оптимизацию импрегнации ванкомицином проводили варьированием давления, времени экспозиции и типа растворителя. Стерилизацию осуществляли потоком быстрых электронов с валидацией эффективности на панели микроорганизмов. Антимикробную активность и кинетику элюции антибиотика определяли микробиологическими методами и высокоэффективной жидкостной хроматографией. Долгосрочную стабильность материала оценивали в течение 24 месяцев хранения с контролем стерильности и сохранения антимикробных свойств.

2.2.1 Очистка аллогенного костного материала

Для делипидизации и очистки материала использовали комбинацию химических и физических воздействий до получения минерально-коллагенового матрикса при сохранении микроархитектоники губчатой кости.

Блоки губчатой аллокости после размораживания экспонировали в 3% растворе перекиси водорода при комнатной температуре в течение 24-48 ч при соотношении ткань: раствор не менее 1:4, со сменой раствора через 24 ч.

Циклическую физико-химическую очистку начинали с отмывки в дистиллированной воде в водяной шейкерной бане GFL 1083 (Германия) в течение 1 ч при 40-57°C с последующей 15-минутной промывкой проточной водой под давлением. Далее проводили серию циклов А-Г, чередуя химическую экспозицию с физическими воздействиями в водяной шейкерной бане GFL 1083, ультразвуковой мойке Finnsonic-15170 m15 (Финляндия) и на орбитальном шейкере Biosan ES-20 (Латвия) при частоте вращения 220 об/мин.

Цикл А (эмульгация жиров) выполняли в 10% растворе гидрокарбоната натрия при соотношении материал:раствор не менее 1:2. Последовательно проводили: 20-минутную экспозицию в водяной шейкерной бане GFL 1083 при 40-57°C с последующей промывкой 10-15 мин; обработку в ультразвуковой мойке Finnsonic-15170 m15 10-20 мин при 40-57°C с последующей промывкой 10-15 мин; экспозицию на орбитальном шейкере Biosan ES-20 10-20 мин (220 об/мин) с последующей промывкой 10-15 мин.

Цикл Б (водная отмывка) выполняли в дистиллированной воде при соотношении материал: раствор не менее 1:2 при тех же режимах воздействий, что и в цикле А (водяная шейкерная баня GFL 1083, ультразвуковая мойка Finnsonic-15170 m15, орбитальный шейкер Biosan ES-20). Не менее трёх раз (в среднем 3-5 повторов в зависимости от размера фрагментов).

Цикл В (окислительная очистка) осуществляли в 3% растворе перекиси водорода, предварительно разогретом до 40-57°C, с последовательным воздействием в водяной шейкерной бане GFL 1083 20 мин, в ультразвуковой мойке Finnsonic-15170 m15 10-20 мин и на орбитальном шейкере Biosan ES-20 10-20 мин. Завершали цикл однократной отмывкой в дистиллированной воде при 40-57°C на орбитальном шейкере Biosan ES-20 15 мин при соотношении материал:раствор не менее 1:2.

Цикл Г (обезжиривание) проводили в 70% этаноле при 40-57°C с теми же последовательными физическими воздействиями, что и в цикле А (водяная шейкерная баня GFL 1083 20 мин, ультразвуковая мойка Finnsonic-15170 m15 10-20 мин, орбитальный шейкер Biosan ES-20 10-20 мин), с межэтапными промывками проточной водой 10-15 мин.

После завершения циклов материал трижды промывали дистиллированной водой при 40-57°C на орбитальном шейкере Biosan ES-20 по 15 мин при соотношении материал: раствор не менее 1:2. Очищенные фрагменты высушивали в термостате при 45°C в течение 4-24 ч.

Критериями завершённости очистки служили отсутствие видимого осадка после заключительного повторения цикла Б и отсутствие видимых органических включений и костно-жирового компонента в межтрабекулярном пространстве при визуальной оценке.

2.2.2 Морфолого-элементный анализ

Визуализацию очищенных аллогенных костных блоков выполняли методом сканирующей электронной микроскопии на комплексе Jeol JSM 6390LA (ФГБУН «Ботанический институт им. В. Л. Комарова», Россия). Для анализа случайным образом были отобраны 12 образцов. Образцы помещали в вакуумную камеру, поверхность покрывали тонким слоем золото-палладиевого сплава. Сканирование проводили в режиме высокого вакуума при ускоряющем напряжении до 30 кВ; обеспечивалась пространственная визуализация вплоть до 0,4 нм (по паспорту комплекса). Оценивали сохранность микроархитектоники губчатого матрикса и отсутствие органических включений в межтрабекулярных пространствах.

Элементный анализ поверхности очищённых блоков выполняли методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) на том же электронно-зондовом микроскопическом комплексе. Анализ проводили трёхкратно (n=3) с нормализацией суммарного содержания элементов до 100%.

Регистрировали состав по основным элементам минеральной фазы: O, Na, Mg, P, Ca.

2.2.3 Оценка влияния метода обработки кости на ее прочность

Механические испытания проводили в режиме одноосного сжатия при комнатной температуре. Костные бруски устанавливали вертикально между плоскими зажимами испытательной машины 1958У-10-1. Скорость нагружения составляла 1 мм/мин. По кривым «нагрузка – деформация» определяли модуль упругости (E), прочность на сжатие (σ_r) и предельную относительную деформацию при разрушении (ϵ_r).

2.2.4 Получение ММСК для оценки цитосовместимости очищенного остеозамещающего материала

Материалы включали базовую среду DMEM GlutaMAX с низким содержанием глюкозы (Life Technologies, Великобритания), эмбриональную бычью сыворотку (FCS) в концентрациях 15% для стандартной среды и 10% для остеогенной среды, пенициллин 100 Ед/мл и стрептомицин 100 мкг/мл (Life Technologies, Великобритания). Остеогенные добавки включали β -глицерофосфат 10 ммоль/л, дексаметазон 10 нмоль/л и L-аскорбиновую кислоту 50 мкг/мл (Sigma-Aldrich, США). Для ферментативной диссоциации использовали коллагеназу I 0,075% (РосМедБио, Россия). Буферы и реагенты: фосфатно-солевой буфер (PBS), 4% раствор формалина, раствор ализаринового красного 20 мг/мл в PBS (pH 4,6), дистиллированная вода (ddH₂O), диметилсульфоксид (ДМСО) и раствор МТТ. Расходные материалы включали 6-, 24- и 96-луночные планшеты. Для молекулярно-биологических процедур применяли набор для выделения РНК GeneJET (Thermo Fisher Scientific, США), набор для обратной транскрипции MMLV

RT Kit (Евроген, Россия) и набор для ПЦР в реальном времени qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Праймеры использовали следующих последовательностей (5'–3'):

1. H3F3 – F: GAGGTCTCTATACCATGGCTC,
a. R: GTACCAGGCCTGTAACGATG;
2. BMP2 – F: CGCCTCAAATCCAGCTGTAAG,
a. R: GGGCCACAATCCAGTCGTT;
3. RUNX2 – F: GACTGTGGTTACCGTCATGGC,
a. R: ACTTGGTTTTTCATAACAGCGGA.

Оборудование включало CO₂-инкубатор при 37 °C и 5 % CO₂, световой микроскоп EVOS (Thermo Fisher Scientific, США), спектрофотометр SPECTROstar NANO (BMG, Германия) и амплификатор CFX (Bio-Rad, США).

Выделение ММСК из жировой ткани выполняли с целью получения первичной культуры. Жировую ткань забирали из паховой области кроликов породы советская шиншилла. Ткань взвешивали, механически измельчали скальпелем и инкубировали 30 мин при 37 °C в 0,075% растворе коллагеназы I. Фермент инактивировали добавлением равного объёма стандартной среды. Суспензию центрифугировали 5 мин при 2000 об/мин, надосадок удаляли. Полученную стромально-васкулярную фракцию ресуспендировали в стандартной среде из расчёта 100 мг ткани на 1 мл. Суспензию засевали в 6-луночные планшеты по 1 мл на лунку и добавляли 4 мл стандартной среды. Клетки инкубировали 24 ч при 37 °C и 5 % CO₂ до прикрепления, затем выполняли замену среды. Культивирование продолжали до пассажа 4, выполняя разбавление при достижении плотности 80 %.

2.2.5 Оценка цитосовместимости очищенного остеозамещающего материала

Оценку жизнеспособности ММСК в костных блоках проводили методом МТТ для количественной регистрации метаболической активности после

заселения. Костные блоки (5х5х5 мм) помещали в 24-луночные планшеты. В каждый блок вносили 200 мкл стандартной среды DMEM, содержащей 250×10^3 и 500×10^3 ММСК кролика, и инкубировали 30 мин при 37 °С и 5 % CO₂. Затем в каждую лунку добавляли 1,5 мл стандартной среды и культивировали 7 дней. На 3-й день блоки переносили в новый планшет; среду заменяли на свежую дважды в течение инкубации. В последний день добавляли раствор МТТ до конечной концентрации 1 мг/мл и инкубировали 3 ч при 37 °С. Блоки осушали на фильтре и экстрагировали формазан 5 мин в 1,5 мл ДМСО. По 200 мкл экстракта переносили в 96-луночный планшет и измеряли оптическую плотность при 540 нм с референсной длиной волны 620 нм на спектрофотометре SPECTROstar NANO. Блоки без ММСК использовали как отрицательный контроль фонового сигнала.

Остеогенную дифференцировку ММСК выполняли для индукции минерализации внеклеточного матрикса. Клетки пассажа 4 засевали в 24-луночные планшеты по 250×10^3 клеток на лунку и культивировали при 37 °С и 5 % CO₂ до прикрепления. Среду заменяли на остеогенную и обновляли каждые 3 дня в течение 14 дней.

Визуализацию кальцифицированного матрикса проводили окраской ализариновым красным. На 14-й день остеогенной стимуляции клетки дважды промывали PBS и фиксировали в 4% растворе формалина 10 мин. После двукратной промывки дистиллированной водой препараты инкубировали 10 мин при комнатной температуре в растворе ализаринового красного 20 мг/мл в PBS (pH 4,6). Затем клетки промывали дважды дистиллированной водой и один раз PBS. Результаты документировали с использованием микроскопа EVOS.

Оценку экспрессии генов остеогенной дифференцировки выполняли методом ПЦР в реальном времени. На 14-й день стимуляции тотальную РНК выделяли из культуры ММСК набором GeneJET в соответствии с инструкцией производителя. Синтез кДНК проводили с использованием набора MMLV RT Kit (Евроген, Россия). Реакцию ПЦР в реальном времени выполняли с qPCRmix-HS SYBR на амплификаторе CFX. Объем реакции составлял 25 мкл, конечная

концентрация кДНК – 1 нг/мл. Температурный режим включал денатурацию при 95 °С 300 с, затем 40 циклов: 95 °С 30 с, 57 °С 30 с, 72 °С 30 с.

2.2.6 Импрегнация костного материала антибиотиком (ванкомицин)

Для оптимизации процесса импрегнации ОЗ материала ванкомицином (Ванкобакт, Фармасинтез АО, Россия) было исследовано влияние трех параметров: давления, времени импрегнации и типа растворителя (таблица 2.1.).

Давление при импрегнации варьировалось от атмосферного (≈ 1013 hPa) до пониженного (7-10 hPa) при температуре раствора от +2°С до +8°С. Такое давление позволяет достигнуть условий, при которых вода будет находиться в состоянии до закипания, что обеспечит наилучшее проникновение антибиотика внутрь пористой структуры материала и его эффективную импрегнацию.

Исследуемый период времени импрегнации составил от 5 минут до 24 часов. Короткие периоды импрегнации (5 и 60 минут) были выбраны для оценки возможности быстрого насыщения материала антибиотиком, что важно для практического применения методики и потенциального снижения общих сроков изготовления конечного изделия. Длительная экспозиция (24 часа) позволяла оценить максимально возможную степень насыщения материала при различных условиях.

В качестве растворителей были использованы:

- дистиллированная вода (H_2O) как базовый растворитель;
- 50% раствор этанола, обладающий лучшей проникающей способностью за счет меньшего поверхностного натяжения;
- комбинация 50% этанола с 5% поливинилпирролидоном (ПВП), где полимерная добавка должна была обеспечить лучшую стабилизацию и удержание антибиотика в структуре имплантата.

Объем раствора зависел от расчётной плотности растворителей исходя из необходимости достижения массового процента АБ – 5%. Водный раствор имеет

плотность примерно 1 г/мл, тогда как 50% спиртовой раствор обладает меньшей плотностью ($\sim 0,93$ г/мл), а в случае использования 50% спиртового раствора с добавлением ПВП, плотность раствора слегка увеличивается ($\sim 0,94$ г/мл). Для каждой методики использовалось по 3 образца губчатой кости.

Сравнительный анализ методик проводился путем последовательного изменения одного параметра при фиксированных значениях остальных.

Таблица 2.1 Исследуемые параметры импрегнации образцов оригинального ОЗ-материала ванкомицином

<i>Методика, №</i>	<i>Растворитель</i>	<i>V p-ра, мл</i>	<i>Давление (hPa)</i>	<i>Время импрегнации</i>
1	H2O	20	≈ 1013	60 минут
2	H2O	20	≈ 1013	24 часа
3	H2O	20	7-10	5 минут
4	H2O	20	7-10	60 минут
5	H2O	20	7-10	24 часа
6	Этанол 50%	21.5	7-10	60 минут
7	Этанол 50% + ПВП 5%	21.2	7-10	60 минут

2.2.7 Стерилизация очищенного и импрегнированного материала

Оценку эффективности стерилизации проводили на 35 образцах костных кубовидных блоков с размером ребра 5 мм после этапа лиофилизации. На образцы наносили 20 мкл бактериальной суспензии, концентрация которой составляла приблизительно 2×10^8 КОЕ/мл. За счет губчатой структуры кости, бактериальная суспензия проникала внутрь образца. В эксперименте было использовано 7 штаммов разных видов микроорганизмов (бактерии и дрожжи) (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*), по 5 костных образцов на каждый упомянутый штамм. После заражения образцы помещали в пакеты для стерилизации паковали в двойную полиэтиленовую упаковку «КЛИНИПАК» (Россия). Конечную стерилизацию ионизирующим излучением потоком быстрых

электронов выполняли на радиационно-технологической установке с линейным ускорителем электронов УЭЛР-10-10-С2 дозой поглощения 25 кГр (ООО «Рад», Россия, Ленинградская область, г. Всеволожск, пр. Всеволожский, д. 117, к. 1).

2.2.8 Оценка антимикробной активности образцов разрабатываемого остеопластического материала

Для определения антимикробной активности (АМА) каждый импрегнированный антибиотиком образец помещали в отдельную стерильную пробирку, содержащую 3 мл физиологического раствора. В качестве отрицательного контроля использовали образец без ванкомицина. Инкубировали при 37⁰С в течение 18-24 часов. Готовили взвесь тестируемых изолятов с оптической плотностью 0,5 по McF, наносили ватным тампоном на агар Мюллера-Хинтона и распределяли по поверхности. В качестве тест-штаммов использовали эталонных штаммов *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) с МИК ванкомицина 1,5 мг/мл. Взвесь суточной культуры бактерий (0,5 McF) распределяли по поверхности агара Мюллера-Хинтона. После инкубации 10 мкл инкубационного раствора с образцами наносили на бактериальный газон в 3 повторах и инкубировали сутки при 37⁰С. Формирование зоны подавления роста в месте нанесения капли надосадка расценивали как наличие достаточной концентрации ванкомицина для подавления роста бактерий. Динамику элюции ванкомицина оценивали визуально по наличию и размеру (диаметр, мм) зоны подавления роста MRSA. Ежедневно заменяли физиологический раствор и добавляли свежий в пробирку с образцом. Процедуру повторяли до отсутствия видимой зоны подавления роста в чашках Петри.

2.2.9 Оценка стабильности антимикробной активности при длительном хранении

Для оценки стабильности АМА образцов, импрегнированных ванкомицином, проводили исследование через 6, 12, 18 и 24 месяца после стерилизации. В данном исследовании использовалась и изучалась только методика 7 (импрегнация в 50% этаноле с 5% поливинилпирролидоном в условиях вакуума при давлении 7-10 hPa в течение 60 минут), как наиболее эффективная по результатам сравнительного анализа методик импрегнации. Экспериментальная методика соответствовала описанной в разделе 2.2.1. Образцы (n=3) хранили в стерильной упаковке при комнатной температуре без воздействия прямых солнечных лучей. АМА оценивали по диаметру зон подавления роста метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA, штамм ATCC 43300 с МИК ванкомицина 1,5 мкг/мл) на агаре Мюллера-Хинтона, а также по длительности элюции антибиотика (в днях), определяемой как период, в течение которого наблюдалась видимая зона подавления роста.

2.2.10 Исследование элюции антибиотика (ванкомицин) из полученного материала

Для количественной оценки кинетики высвобождения ванкомицина из полученного материала был разработан аналитический протокол, позволяющий с высокой точностью определять элюцию антибиотика в течение всего периода наблюдения.

Концентрацию ванкомицина в инкубационном растворе определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе SHIMADZU, колонка Shim-pac HR-ODS (Япония). Из пробирок с образцами 1 мл суточного инкубационного раствора переносили в эппендорф и центрифугировали 5 минут,

13 000 об/мин. Затем надсадок переносили в виалу и помещали в хроматограф. Объем вводимой пробы – 100 мкл. Скорость потока 0,45 мл/мин. Продолжительность анализа 25 мин. Время удержания ванкомицина на хроматограмме - 8,5 минут. В течение первых 7 суток инкубационный раствор разбавляли в 1000 раз, и полученные концентрации умножали на коэффициент разведения. Для калибровки ВЭЖХ использовали стандартные растворы ванкомицина в концентрациях от 0,1 до 10 мг/мл. Калибровочную кривую строили по пиковой площади, соответствующей времени удержания ванкомицина (8,5 минут). Анализ хроматограмм выполняли в программе LabSolutions, обеспечивая точность и воспроизводимость измерений путем проведения триплетных анализов каждой пробы.

2.2.11 Оценка стерильности материала и условий хранения

Испытания на стерильность проводили согласно ISO 11737-2. Костные блоки помещались в питательную среду (Тиогликолевая среда) и выдерживались в термостате с температурой инкубации $(30 \pm 2) ^\circ\text{C}$ и периодом 14 дней. После чего оценивали наличие бактериального роста: визуально (помутнение среды) и при помощи посева по 10 мкл на плотную питательную среду (Агар Эндо, ООО «НИЦФ», Колумбийский агар с бараньей кровью, ООО «Биомедиа»,). Чашки с плотной питательной средой инкубировали при 37°C в течение суток. По истечении суток оценивали наличие или отсутствие бактериального роста.

Для оценки стерильности материала при долгосрочном хранении аналогичные испытания проводили на контрольных образцах через 6, 12, 18 и 24 месяца хранения в стандартных условиях (при комнатной температуре, без воздействия прямых солнечных лучей). На всех контрольных сроках применялась идентичная методика культивирования с использованием тех же питательных сред и условий инкубации. Данный подход позволил комплексно оценить сохранение стерильности материала на протяжении двухлетнего периода наблюдения.

2.3 Материалы *in vivo* методов исследования

Экспериментальная часть *in vivo* выполнена в соответствии с международными этическими стандартами и одобрена локальным этическим комитетом. В исследовании использованы половозрелые кролики породы шиншилла, рандомизированные на равные группы для моделирования асептического и септического костных дефектов. Животные содержались в стандартных условиях вивария с контролируемыми параметрами среды. Оперативные вмешательства выполнялись под общей анестезией в асептических условиях. Эвтаназия осуществлялась в соответствии с принципами гуманного обращения с лабораторными животными.

2.3.1 Экспериментальные животные и условия проведения исследований *in vivo*

Экспериментальная часть *in vivo* выполнялась в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Council of the European Communities, Directive 86/609/EEC, Страсбург, 1986), а также с требованиями ISO 10993-2 и рекомендациями руководства «The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (National Research Council, 1996). Протокол был рассмотрен и одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ ТО им. Р. Р. Вредена» Минздрава России, соблюдались стандарты надлежащей лабораторной практики (Приказ Минздрава РФ №708н от 23.08.2010).

Исследование выполнено на 36 половозрелых кроликах-самках породы Советская шиншилла массой 2500–3500 г (средний возраст 7 месяцев), содержащихся в виварии ФГБУ «НМИЦ ТО им. Р. Р. Вредена» Минздрава России, соответствие санитарно-ветеринарным требованиям подтверждалось

сертификатами качества и состояния здоровья. Животные проходили акклиматизацию в условиях вивария не менее 7 суток до начала вмешательств. Содержание осуществлялось в стандартных металлических клетках по 3 особи при фиксированном фотопериоде (12 часов свет/12 часов темнота), принудительной вентиляции с не менее чем 12-кратным воздухообменом в час, температуре 18–26 °С и относительной влажности 30–70%. Санитарно-гигиенический режим поддерживался в соответствии с внутренним регламентом вивария и вышеуказанными руководствами.

В качестве подстилки применялась древесная стружка LIGNOCEL (J. Rettenmaier & Söhne GmbH + Co. KG, Германия), заменяемая по установленному графику и при намокании. Кормление осуществлялось специализированным гранулированным комбикормом для кроликов, дополнительно в рацион включались сочные корма (морковь, капуста) и витаминные добавки согласно утвержденной схеме. Корм и вода предоставлялись без ограничений (*ad libitum*). Фильтрованная водопроводная вода подавалась в стандартных стеклянных бутылках объёмом 500 мл с конической поилкой из нержавеющей стали; микробиологический контроль питьевой воды проводился периодически, результаты протоколировались и хранились в документации лаборатории. Данные производителя о составе и качестве комбикорма также хранились в архиве лаборатории.

2.4 Экспериментальные *in vivo* методы исследований

Эффективность разработанного остеозамещающего материала оценивали на двух моделях костных дефектов у кроликов породы Советская шиншилла. Было проведено две серии экспериментов. В первой серии экспериментов на 18 животных (группы 1О и 1С) изучали остеоинтеграцию материала в условиях асептического дефекта большеберцовой кости, сравнивая оригинальный лиофилизированный материал со свежемороженой губчатой костью. Во второй серии на 18 животных (группы 2О и 2С) оценивали эффективность материала,

импрегнированного ванкомицином, при лечении экспериментального остеомиелита, вызванного *S. aureus*, в сравнении с коммерческим материалом ReproBone. Комплексная оценка результатов включала гистологическое исследование с морфометрическим анализом по стандартам ASBMR, микробиологический контроль эрадикации инфекции, рентгенологический мониторинг репаративных процессов на сроках 14, 45 и 90 суток.

2.4.1 Периоперационное ведение экспериментальных животных

Предоперационная подготовка проводилась с учетом видоспецифических особенностей: длительное голодание не применялось, во избежание желудочно-кишечного стаза допускалось кратковременное ограничение концентрированных кормов за 2–4 часа до анестезии при свободном доступе к воде. Оперативные вмешательства выполнялись в условиях асептики, после обработки операционного поля раствором повидон-йода 10%. Комбинированная общая анестезия достигалась последовательным введением препаратов: сначала выполнялась внутримышечная инъекция диазепама в дозе 5 мг/кг в верхненаружный квадрант бедра с аспирационной пробой перед инъекцией для исключения внутрисосудистого попадания, а затем следовало внутривенное введение кетамина гидрохлорида в дозе 50 мг/кг. Объем вводимого раствора рассчитывался по формуле: $V \text{ (мл)} = D \text{ (мг/кг)} \times m \text{ (кг)} / C \text{ (мг/мл)}$, где D – расчетная доза кетамина, m – масса животного, C – концентрация используемого раствора.

В послеоперационном периоде в течение 3 суток животным проводили обезболивание с использованием мелоксикама (ветеринарная форма): 0,2 мг/кг подкожно в день операции, далее 0,1 мг/кг/сутки подкожно ещё 2 суток и антибиотикотерапию – цефтриаксон (Красфарма ПАО, Россия) в дозировке 50 мг/кг, один раз в сутки внутримышечно

Эвтаназия осуществлялась передозировкой тиопентала натрия внутривенно (ушная вена) в дозе 200 мг/кг медленной болюсной инъекцией до наступления

апноэ и асистолии с последующим подтверждением смерти (отсутствие корнеального рефлекса и сердечной деятельности). Объем рассчитывался по той же формуле: $V \text{ (мл)} = D \text{ (мг/кг)} \times m \text{ (кг)} / C \text{ (мг/мл)}$. Использование фиксированных абсолютных доз не применялось; дозирование проводилось строго в пересчете на массу тела каждого животного.

2.4.2 Применение оригинального остеозамещающего материала в условиях асептического дефекта у кроликов

Исследование выполнено на 18 половозрелых кроликах-самках породы Шиншилла массой (средний возраст 7 месяцев). Всем животным в асептических условиях под общей анестезией (согласно пункту 2.3.1.) после выполнения хирургического доступа к большеберцовой кости в ее проксимальном метаэпифизе (антеролатеральный доступ - по наружной поверхности) при помощи бора, 400 об/мин (РЭСТАР-03 КОЛИБРИ ЭКО, ООО "РЭСТАР") с постоянным охлаждением физиологическим раствором формировали полостной асептический дефект размером 8 мм в ширину и 6 мм в глубину.

Животные были разделены на две группы: в основной группе (1О) дефект замещали с применением ксенокости, заготовленной согласно разработанной методике (n=9), в группе сравнения (1С) - свежзамороженной стерильной губчатой ксенокостью (n=9). Имплантируемый материал плотно укладывали в костную полость до полного заполнения объема. Рану ушивали послойно и обрабатывали антисептиком (повидон-йод 10%, согласно инструкции завода изготовителя).

Животных выводили из эксперимента (см. 2.3.1) на 14, 45 и 90 сутки после операции, затем забирали блоки тканей с областью имплантированного ОЗ материала и выполняли гистологическое исследование. При микроскопии гистологических стекол проводили качественную и полуколичественную оценку динамики тканевых изменений в области дефекта. На 14 сутки оценивали наличие фибрина, эритроцитов, детрита и фрагментов имплантата, особенности клеточной

инфильтрации (асептическое реактивное воспаление, формирование грануляционной ткани), признаки раннего остеогенеза на поверхности имплантата (остеокондукция) и в толще клеточно-волокнутой ткани (остеоиндукция). На 45-е и 90-е сутки оценивали состояние кортикальной пластинки (оценка наличия или отсутствия несращения), характер и зрелость ткани в зоне дефекта, состояние имплантата: наличие инкапсуляции фиброзной тканью, степень резорбции костных фрагментов, реорганизацию костномозгового канала и наличие кроветворного костного мозга.

2.4.3 Применение оригинального остеозамещающего материала с антимикробной активностью в условиях остеомиелитического дефекта у кроликов

Исследование выполнено на 18 половозрелых кроликах-самках породы Шиншилла массой (характеристики и условия содержания согласно п. 2.3.1.). Животные были случайным образом разделены на две равные группы: основную (2О, n=9) и группу сравнения (2С, n=9).

На первом этапе всем животным (n=18) под общей анестезией (согласно п. 2.3.1) моделировали локализованный метафизарный хронический остеомиелит согласно методике, описанной в патенте RU 2 622 209 С1, с применением бора, 400 об/мин (РЭСТАР-03 КОЛИБРИ ЭКО, ООО "РЭСТАР")

На втором этапе через 3 недели после инфицирования всем животным выполняли радикальную хирургическую обработку остеомиелитического очага с удалением секвестров, некротизированных тканей и гнойного содержимого, промывкой растворами антисептиков (перекись водорода) и замещением сформированного дефекта.

Животным основной группы (2О, n=9) дефект замещали разработанным биodeградируемым минерализованным остеозамещающим материалом, импрегнированным ванкомицином из расчета 1 г антибиотика на 10 г материала. В

группе сравнения (2С, n=9) дефект замещали коммерческим остеопластическим материалом ReproBone® Granules - Ceramisys UK представляющим собой двухфазную керамику на основе трикальцийфосфата и гидроксиапатита (β -ТКФ/ГА). Непосредственно перед имплантацией материал перемешивали с ванкомицином в том же соотношении (1 г на 10 г материала). Остеозамещающий материал плотно имплантировали в подготовленное ложе дефекта до полного заполнения объема, после чего рану послойно ушивали и обрабатывали антисептиком.

Животных выводили из эксперимента на 14, 45 и 90 сутки после хирургического лечения (по 3 животных из каждой группы на каждом сроке). Затем забирали блоки тканей с областью имплантированного ОЗ материала и выполняли гистологическое (см. п 2.4.4) и микробиологическое (см. п 2.4.5) исследования. При микроскопии гистологических стекол оценивали в динамике особенности воспалительной реакции, состояние имплантата: наличие и размер некротизированных костных балок и их фрагментов, степень васкуляризации и процессы неоостеогенеза, а также морфометрические показатели.

2.4.4 Гистологическое исследование

Изъятые костные блоки, включающие область замещенного дефекта и прилежащие ткани, немедленно фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина в течение 48 часов. После фиксации образцы подвергали декальцинации в растворе на основе этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), далее образцы обезжировали в серии спиртов восходящей концентрации и заключали в парафиновые блоки по стандартной гистологической методике. С полученных блоков при помощи ротационного микротома изготавливали серийные срезы толщиной 8 мкм, которые монтировали на предметные стекла и окрашивали с использованием нескольких методик: гематоксилином и эозином для обзорной оценки общей морфологической картины и клеточного состава; пикрофуксином по

методу Ван Гизона для дифференциации зрелого костного матрикса; и альциановым синим при pH 2,5 для выявления хрящевой ткани.

Микроскопию и получение цифровых изображений проводили с использованием светового микроскопа Leica DM2000, оснащенного цифровой камерой (Leica Microsystems, Германия).

Морфометрический анализ проводили методом цифровой планиметрии на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, с использованием программного обеспечения Leica Application Suite (Leica Microsystems, Германия). Для каждого гистологического препарата анализировали 10 непересекающихся полей зрения в центральной зоне дефекта при ув. $\times 400$. В соответствии с гистоморфометрической номенклатурой, рекомендованной Американским обществом исследования костной и минеральной ткани (ASBMR) (Parfitt A.M. et al., 1987; Dempster D.W. et al., 2013), определяли следующие первичные параметры: периметр костной ткани (B.Pm, мкм), периметр некротизированной кости (Nc.B.Pm, мкм), периметр, занятый остеокластами (Oc.Pm, мкм) и остеобластами (Ob.Pm, мкм), площадь воспаления (Inf.Ar, мкм^2) и общую площадь препарата (T.Ar, мкм^2). На основе первичных данных рассчитывали относительные показатели, характеризующие клеточную активность и тканевые процессы: относительный периметр резорбции (Oc.Pm/B.Pm, %), относительный периметр костеобразования (Ob.Pm/B.Pm, %), долю некротизированной кости (Nc.B.Pm/B.Pm, %) и относительную площадь воспаления (Inf.Ar/T.Ar, %).

2.4.5 Микробиологическое исследование

Тканевые биоптаты для микробиологического исследования забирали стерильными инструментами из центральной зоны костного дефекта во время saniрующей операции (2-й этап, 0-е сутки) и при выведении животных из эксперимента на модели остеомиелита на сроках 14, 45 и 90 суток.

Полученные биоптаты помещались в стерильные контейнеры с транспортной средой и доставлялись в микробиологическую лабораторию в течение 2 часов. В лаборатории образцы гомогенизировались и из полученной суспензии готовились серийные разведения. Посев производился на питательные среды. Инкубация проводилась при 37°C в течение 24-48 часов с дополнительным контролем через 72 часа.

Идентификация *S. aureus* выполнялась на основании культурально-морфологических свойств, положительных тестов на каталазу и коагулазу, а также микроскопии окрашенных по Граму препаратов. Количественная оценка проводилась путем подсчета колониеобразующих единиц с пересчетом на грамм ткани. Результаты выражались в lg КОЕ/г. Клинически значимой считалась бактериальная нагрузка $\geq 10^5$ КОЕ/г ткани после формирования остеомиелитического дефекта, при выполнении второго этапа оперативного лечения. Отрицательным результатом считалось отсутствие роста *S. aureus* после 72 часов инкубации.

2.4.6 Лучевые исследования

Всем лабораторным животным, включенным в эксперименты, выполняли рентгенологические исследования в послеоперационном периоде на 1-е, 45-е и 90-е сутки. Укладку выполняли в положении животного на спине с центрацией рентгеновских лучей на область коленных суставов. Рентгенографию в боковой проекции выполняли в положении животного на боку, держа за задние лапы. Рентгенологические исследования выполняли в двух стандартных проекциях в контрольные сроки. Для выполнения рентгенографии использовали аппарат «Phillips Diagnost». Условия съемки: 42 kV, 5.00 mAs, 22,9 мс. Фокусное расстояние составляло 1 м. При рентгенологическом исследовании у животных оценивали: границы костного дефекта, характер содержимого костной полости, зоны просветления в дефекте, признаки реорганизации.

2.5 Материалы клинической части исследования

Клиническая часть исследования выполнена на базе 4-го отделения гнойной хирургии и научного отдела профилактики и лечения раневой инфекции ФГБУ «НМИЦ ТО им. Р. Р. Вредена» Минздрава России. Проведено одноцентровое амбиспективное сравнительное исследование клинической эффективности и безопасности замещения полостных костных дефектов у больных с хроническим остеомиелитом костей верхних и нижних конечностей. В исследование последовательно включены 50 пациентов, которым выполнялся второй этап хирургического лечения в период с января 2018 г. по январь 2022 г. Распределение по группам осуществлялось по принципу последовательного включения в зависимости от периода лечения: группа сравнения (ретроспективная) (2018–2020 гг.) и основная группа (проспективная) (2020–2022 гг.).

2.5.1 Общая характеристика пациентов, включенных в исследование

В исследование были включены 50 пациентов с хроническим остеомиелитом костей верхних и нижних конечностей, которым в условиях гнойного отделения НМИЦ ТО им. Р.Р. Вредена выполнялся второй этап хирургического лечения ОМ в период 2018-2022 гг.

Критерии включения пациентов:

- Диагностированный хронический остеомиелит верхних и нижних конечностей 3 и 4 анатомического типа физиологического класса А или В (по классификации Cierny-Mader);
- Ранее был выполнен первый этап хирургического лечения хронического остеомиелита в объеме - радикальная хирургическая обработка очага инфекции с удалением некротизированных и явно нежизнеспособных тканей,

с формированием полостного костного дефекта и его замещением антимикробным спейсером в виде бус из ПММА;

- Отсутствие признаков рецидива хронического инфекционного процесса на момент поступления, на основании клинических и лабораторных данных (клинический анализ крови, С-реактивный белок (СРБ), локально – отсутствие признаков воспалительного процесса в месте предшествующего оперативного лечения);
- Возможность проведения длительной (не менее 6-8 недель), в том числе пероральной АБ-терапии, согласно АБ-чувствительности микроорганизмов, выделенных в результате микробиологического исследования интраоперационных тканевых биоптатов и удаленных металлоконструкций на первом этапе лечения;
- До начала проведения оперативного лечения с использованием аллогенной кости с антибактериальными препаратами все пациенты подписывали информированное добровольное согласие. Исследование получило одобрение локального этического комитета.

Пациенты были разделены на две группы по 25 человек в каждой в зависимости от остеопластического материала, которым замещали дефект при выполнении второго этапа лечения. В группе сравнения (ретроспективной - 2018-2020 гг.) применяли ReproBone® (3-кальций-фосфат с гидроксиапатитом, далее ЗКФ-ГА) с интраоперационно смешанный с ванкомицином. В основной группе (проспективной - 2020-2022 гг.) имплантировали оригинальный биодеградируемый минерализованный костнопластический материал, импрегнированный ванкомицином.

Сформированные группы (таблица 2.2) были полностью сопоставимы по основным демографическим показателям: возрасту ($p = 0,338$) и половому составу ($p = 1,000$) с преобладанием мужчин в обеих группах (68,0%). По клиническим характеристикам статистически значимых различий в локализации патологического процесса ($p = 0,069$) и этиологии остеомиелита ($p = 0,462$) также

не выявлено. В обеих группах преобладал вторичный остеомиелит (76,0% и 88,0% соответственно) и поражение костей нижних конечностей. Распределение по классификации Cierny-Mader было также сопоставимо – в большинстве случаев был диагностирован 3-й анатомический тип и физиологический класс В.

Статистически значимо группы различались только по количеству предшествующих операций ($p = 0,027$) и уровню СРБ при поступлении ($p = 0,001$). При этом уровень СРБ у пациентов обеих групп находился в пределах нормы (<5 мг/л), что соответствовало критериям включения и подтверждало отсутствие активного воспалительного процесса. Большее количество операций в анамнезе у пациентов основной группы может свидетельствовать о более сложном течении у них инфекционного процесса.

Таблица 2.2 – 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

2.6 Методы клинической части исследования

В ходе исследования собирали первичные данные, которые включали анализ историй болезни, клинико-демографические параметры (гендерная принадлежность, возраст), анамнестические сведения (продолжительность инфекционного процесса, этиология остеомиелита, количество ранее выполненных вмешательств, предшествующая системная антибактериальная терапия), лабораторные маркеры воспаления, результаты микробиологического мониторинга и оценку тяжести поражения по классификации Cierny-Mader. Для пациентов основной группы, где осуществлялся проспективный сбор данных в отличие от ретроспективного анализа в группе сравнения, дополнительно проводили динамическую оценку остеоинтеграции с помощью рентгенографии и МСКТ. Стандартизованная хирургическая техника для всех пациентов предусматривала радикальную обработку очага с удалением АМ-спейсера и замещением дефекта остеопластическим материалом, а основным критерием эффективности являлась частота рецидивов инфекции при минимальном сроке наблюдения 24 месяца.

2.6.1 Выполнение хирургического вмешательства

Объем хирургического вмешательства при выполнении второго этапа оперативного лечения был идентичен в обеих группах – доступ осуществляли через ранее сформированный послеоперационный рубец. Выполняли иссечение рубцово-измененных тканей, обнажали костный дефект, удаляли антимикробный спейсер из ПММА. Проводили повторную хирургическую обработку очага инфекции с удалением грануляционной ткани, рубцовых тканей, секвестров, некротизированных и явно нежизнеспособных тканей. Выполняли обработку костного ложа фрезой до появления «кровяной росы». Полученные во время операции ткани отправляли на микробиологическое исследование. Костный дефект

промывали растворами антисептиков (0,05% водный раствор хлоргексидина биглюконата, 3% раствор перекиси водорода) и заполняли одним из двух описанных в п. 2.5.1. материалов с установкой системы дренирования (по Редону).

Для обеспечения максимального соответствия разработанного ОЗ материала анатомическим особенностям костного дефекта у каждого пациента, проводилась индивидуальная подготовка трансплантата на основе данных компьютерной томографии (КТ), полученных после первого этапа хирургического лечения. Заранее изготавливались блоки аллогенного костнопластического материала различного размера и конфигурации (в виде кубов с гранями 5-20 мм, пластин толщиной 3-5 мм, крошки фракцией 0,5-10 мм, а также полусфер), что позволяло адаптировать материал под конкретные параметры дефекта. На основании анализа КТ-изображений, включающих 3D-реконструкцию, определялись точные размеры, форма и объем полости, после чего подбирались и комбинировались блоки различных размеров и форм для максимально плотного заполнения дефекта. Такой подход обеспечивал оптимальное прилегание материала к стенкам костной полости, минимизировал пустоты и способствовал лучшей интеграции трансплантата с окружающей тканью.

После замещения костного дефекта рану послойно ушивали. В зависимости от клинической картины и количества дренажного отделяемого, продолжительность дренирования составляла 2-5 дней.

Все пациенты со дня операции получали внутривенную комбинированную эмпирическую или этиотропную АБ терапию с учетом полученных результатов дооперационного микробиологического исследования (МБИ) дооперационного пунктата и/или результатов МБИ за предшествующую госпитализацию. При получении результатов исследования взятых интраоперационно тканевых биоптатов проводили при необходимости коррекцию антибактериальной терапии с последующим переводом пациента на пероральную АБ терапию, общей продолжительностью 6–8 нед.

2.6.2 Клинико-лабораторные методы исследования

Лабораторная диагностика осуществлялась на базе централизованной клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ ТО им. Р.Р. Вредена» Минздрава России. Протокол обследования включал выполнение стандартного комплекса лабораторных тестов на этапе госпитализации и в послеоперационном периоде: общеклинические исследования крови, биохимический профиль, параметры гемостаза.

В рамках настоящего исследования анализировали следующие показатели: уровень СРБ и количество лейкоцитов периферической крови при поступлении и перед выпиской (9-12 сутки послеоперационного периода), регистрировали количество эритроцитов и уровень гемоглобина в до- и послеоперационном периодах.

Взятие крови выполнял квалифицированный персонал в условиях процедурного кабинета профильного отделения гнойной хирургии с использованием вакуумных систем с ЭДТА для гематологических исследований и активатором коагуляции для СРБ.

Количественное определение форменных элементов крови выполняли методом проточной цитометрии на автоматизированном гематологическом анализаторе Beckman&Coulter LH 500 (Beckman Coulter Inc., США). Уровень СРБ определяли иммунотурбидиметрическим методом с использованием анализатора Roche Cobas INTEGRA-800 (Roche Inc., США).

Интраоперационно оценивали следующие параметры: объем костного дефекта (мл), объем кровопотери (мл) и время операции (мин). Объем костного дефекта измеряли путем заполнения полости стерильным физиологическим раствором с использованием 100-миллилитрового шприца Жане. В послеоперационном периоде учитывали продолжительность дренирования раны (дни), а также характер раневого отделяемого (серозное, гнойное, геморрагическое).

2.6.3 Микробиологические методы исследования

Микробиологическая диагностика являлась обязательным компонентом комплексного обследования пациентов с хроническим остеомиелитом. Забор биологического материала осуществлялся интраоперационно.

Протокол забора образцов предусматривал получение множественных тканевых биоптатов (от 3 до 5 фрагментов) из различных участков патологического очага с использованием стерильного инструментария. Полученные образцы тканей незамедлительно помещались в транспортные контейнеры с 4 мл жидкой питательной среды.

Лабораторный этап включал культивирование биоматериала методом прямого посева на селективные и неселективные питательные среды: колумбийский кровяной агар для выделения широкого спектра микроорганизмов, шоколадный агар для культивирования требовательных патогенов, агар Шедлера для анаэробных бактерий.

Идентификация выделенных микроорганизмов и определение их чувствительности к антимикробным препаратам выполнялись согласно действующим нормативным документам (МУК 4.2.1890-04, 2004). Интерпретация результатов антибиотикограмм проводилась в соответствии с актуальными критериями Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST).

2.6.4 Критерии эффективности лечения

Показателем эффективности проводимого лечения для пациентов обеих групп являлось наличие или отсутствие рецидива хронического инфекционного процесса в период наблюдения. Катамнестическое наблюдение осуществлялось посредством плановых контрольных осмотров в амбулаторных условиях,

дистанционного анкетирования и телефонного интервьюирования. Средние сроки наблюдения составили 2,4 года (МКИ 1,875–3,125) - для группы сравнения и 2,2 года (МКИ 1,95–2,78) для основной группы, что позволяет оценить среднесрочные результаты лечения.

2.6.5 Определение локальной концентрации ванкомицина

Локальную концентрацию ванкомицина в дренажном отделяемом определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в дренажном отделяемом на 1-5 сутки у пациентов групп сравнения. Исследование проводили на приборе SHIMADZU, колонка Shim-pac HR-ODS. 1 мл суточного буфера переносили в эппендорф, центрифугировали (13000 об/мин, 5 минут), надосадок переносили в вialу и помещали в хроматограф. Объем вводимой пробы – 100 мкл, продолжительность – 25 мин.

2.6.6 Лучевые методы исследования

Всем включенным в исследование пациентам при поступлении на отделение для 2-го этапа лечения выполняли обзорную рентгенографию пораженного сегмента конечности в прямой и боковой проекциях. При возможности, пациентам выполняли МСКТ пораженного сегмента конечности с 3D-реконструкцией для детальной оценки размеров и формы костного дефекта, выявления мелких секвестров, оценки качества костной ткани, а также ультразвуковое исследование (УЗИ) мягких тканей для выявления жидкостных скоплений, абсцессов, свищевых ходов).

Дополнительно для динамической оценки процессов остеоинтеграции и биодеградации костнопластических материалов пациентам основной группы

выполняли (МСКТ) оперированного сегмента конечности сразу после оперативного лечения и через 18 месяцев после.

Для обеспечения сопоставимости данных все исследования проводили по стандартизированному протоколу: Напряжение на трубке: 120 кВ., Толщина среза: 0,6–1,0 мм., Алгоритм реконструкции: высокоразрешающий костный, построение мультипланарных (MPR) и трехмерных (3D VRT) реконструкций.

Анализ КТ-данных проводили в специализированном программном обеспечении DICOM Viewer с оценкой следующих параметров:

1. **Денситометрический анализ:** определение средней рентгеновской плотности (HU) в зоне интереса и ее динамики. Увеличение плотности свидетельствовало о минерализации, снижение – о резорбции. Отдельно оценивали плотность на границе «имплантат-кость».
2. **Качественная оценка:** визуальный анализ границы между имплантатом и нативной костью на предмет наличия зазоров, непрерывности кортикальной пластинки и трабекулярного рисунка.

2.7 Статистическая обработка данных экспериментальной и клинической частей исследования

Статистическая обработка данных всех разделов исследования проводилась с использованием следующего программного обеспечения: Microsoft Excel 2019, версия 16.72 (Microsoft Corporation, США) для первичной обработки данных; IBM SPSS Statistics, версия 23.0.0.0 (IBM Corporation, США) и Python 3.11.5 с библиотеками NumPy 1.24.3, Pandas 2.0.3, SciPy 1.11.1, Statsmodels 0.14.0 для статистического анализа; GraphPad Prism 10.3.1 (GraphPad Software Inc., США), Matplotlib 3.7.2 и Seaborn 0.12.2 для визуализации результатов. Все вычисления выполнялись на платформе macOS 15.2.

Проверка нормальности распределения количественных показателей осуществлялась с помощью критерия Шапиро-Уилка для выборок объемом $n < 50$

или критерия Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса. При $p > 0,05$ принималась гипотеза о нормальном распределении данных.

Данные представляли при нормальном распределении в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm SD$), для прочностных характеристик – среднего стандартной ошибки среднего ($M \pm m$), при распределении отличном от нормального – в виде медианы с межквартильным размахом ($Me [Q1; Q3]$). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Различия средних значений результатов *in vitro* исследований между группами оценивали с применением однофакторного дисперсионного анализа (One-Way ANOVA), дополнительно для экспериментов по импрегнации, элюции и антимикробной активности – с апостериорным тестом Тьюки (Tukey's HSD) для попарных сравнений при контроле ошибки I рода.

В качестве интегрального фармакокинетического показателя элюции ванкомицина рассчитывали площадь под кривой «концентрация-время» (AUC_{0-14}) методом трапеций. Связь между концентрацией ванкомицина и диаметром зоны подавления роста оценивали коэффициентом ранговой корреляции Спирмена, а соответствие данных элюции экспоненциальной модели $C(t) = C_0 \times e^{(-kt)}$ – с применением коэффициента детерминации (R^2) или с поправкой Холма-Бонферрони на множественные сравнения. Интерпретация силы связи: $|\rho| < 0,3$ – слабая, $0,3 \leq |\rho| < 0,7$ – умеренная, $|\rho| \geq 0,7$ – сильная корреляция.

При распределении данных отличном от нормального анализ проводили непараметрическими методами. Для множественных межгрупповых сравнений применяли критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна и поправкой Бонферрони ($\alpha' = \alpha/k$, где k – количество сравнений). Динамику изменений во времени анализировали методом линейной регрессии ($y = \beta_0 + \beta_1 x + \varepsilon$) для параметров с линейным трендом и полиномиальной регрессии второй степени ($y = \beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 x^2 + \varepsilon$) для нелинейной динамики. Выбор модели осуществлялся на основе информационного критерия Акаике (AIC).

В клинической части исследования для сравнения количественных показателей между группами применяли U-критерий Манна-Уитни. Для анализа

категориальных переменных применяли критерий χ^2 (при ожидаемых частотах ≥ 5) и точный критерий Фишера (при ожидаемых частотах < 5 или для таблиц 2×2).

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ОРИГИНАЛЬНОГО ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

В настоящей главе последовательно изложены и обобщены результаты, полученные в ходе экспериментального исследования по разработке способа получения оригинального остеопластического материала, оценке его физико-химических и биомеханических характеристик, а также изучению биологических свойств в серии экспериментов на культуре клеток. Кроме того, был проведен сравнительный анализ процессов биоинтеграции и ремоделирования разработанного материала и свежесамороженной аллокости в эксперименте *in vivo* на 18 кроликах породы Советская шиншилла с периодом наблюдения 90 суток.

3.1 Разработка и физико-химические характеристики оригинального остеопластического материала

3.1.1 Способ получения лиофилизированного остеопластического материала

Для получения очищенного, стерильного и биосовместимого минерально-коллагенового матрикса был разработан и стандартизирован комплексный пятифазный протокол обработки аллогенной костной ткани. Данный способ был направлен на эффективное удаление всех потенциально иммуногенных компонентов (клеток, жира, растворимых белков) при максимальном сохранении нативной трехмерной структуры и неорганического состава костной ткани (таблица 3.1.). Фаза I – заготовка донорского материала. В асептических условиях операционной производили забор головок бедренных костей от прижизненных доноров, прошедших обязательный скрининг на гемотрансмиссивные инфекции. Каждую головку помещали в тройную стерильную упаковку с уникальной

маркировкой для обеспечения прослеживаемости и замораживали при температуре -80°C с последующей карантинизацией.

Фаза II – предварительная обработка, включала размораживание материала при комнатной температуре, тщательное механическое удаление остатков мягких тканей и суставного хряща, а также фракционирование губчатой кости на заготовки необходимой конфигурации (блоки, чипсы, крошка) (рисунок 3.1.А). Далее следовала первичная химическая обработка, в ходе которой фрагментированные образцы погружали в 3% раствор перекиси водорода с экспозицией 24-48 часов (рисунок 3.1.Б). Предварительная обработка обеспечивала первичную деконтаминацию и окисление легкодоступных органических компонентов, в частности остатков крови.

Фаза III – циклическая физико-химическая очистка с целью удаления антигенных компонентов в условиях повышенной температуры ($40-57^{\circ}\text{C}$) для интенсификации всех процессов. Ключевой особенностью разработанного протокола являлась комбинация химического воздействия с комплексом физических методов для достижения максимальной степени очистки. Применение разнонаправленных физических факторов, таких как покачивающие движения в водяной шейкерной бане, низкочастотная ультразвуковая кавитация (22-28 кГц) и орбитальное вращение (220 об/мин) (рисунок 3.1.Г) обеспечивало механическое вымывание и разрушение клеточных и белковых конгломератов, а также их эффективное удаление из глубоких пор костного матрикса. Процесс был разделен на четыре последовательных цикла:

Цикл А (Делипидизация): Обработка в 10% водном растворе гидрокарбоната натрия для эмульгирования жиров и их перевода в водорастворимую форму (рисунок 3.1.В).

Цикл Б (Удаление детрита): Многократная (не менее 3-5 раз) отмывка материала в дистиллированной воде для удаления остатков детергентов и клеточного детрита. Критерием завершения служило получение визуально прозрачной надосадочной жидкости после центрифугирования.

Цикл В (Окислительная очистка): Повторная обработка в 3% растворе перекиси водорода для удаления стойких белковых и пигментных включений.

Цикл Г (Финальная делипидизация): Обработка 70% раствором этанола для удаления остаточных липидов и подготовки материала к сушке.

Каждый из циклов завершали тщательным промыванием дистиллированной водой для полного удаления химических реагентов.

Фаза IV – сушка и лиофилизация, направлена на удаление влаги при сохранении структуры материала. Предварительно просушивали материал при 45°C до влажности менее 20%. Затем материал замораживали при -80°C и подвергали сублимационной сушке в течение 40 часов в установке HETO PowerDry PL3000 (Дания) (рисунок 3.1.Д). Процесс включал первичную сушку при -40°C и вторичную с постепенным нагревом до +40°C, что позволяло достичь конечной остаточной влажности 3-5%.

Фаза V – конечная обработка – включала упаковку высушенного материала в двойные радиационно-стойкие полиэтиленовые пакеты, нанесение маркировки с указанием партии и даты изготовления. Стерилизацию упакованного продукта проводили на радиационно-технологической установке потоком быстрых электронов дозой излучения 20 ± 5 кГр. Образцы, прошедшие полный цикл обработки, использовали во всех последующих исследованиях (рисунок 3.1.Е).



Рисунок 3.1 – Этапы протокола очистки разрабатываемого материала:

А – механическая очистка от хряща и мягких тканей; Б – первичная обработка перекисью водорода; В – делипидизация в растворе 10% NaHCO_3 ; Г – промывка в орбитальном шейкере; Д – лиофилизация; Е – очищенный и лиофилизированный материал

Таблица 3.1 – Протокол изготовления лиофилизированного минерально-коллагенового матрикса из ГБК

№	Этап/Операция	Параметры процесса	Время	Контрольные точки
ФАЗА I: ЗАГОТОВКА ДОНОРСКОГО МАТЕРИАЛА				
1.1	Изъятие ГБК	• Условия операционной • Асептическая техника	5 мин	• Визуальная оценка • Отсутствие повреждений
1.2	Упаковка	• Тройная стерильная упаковка • Маркировка донора	5 мин	• Герметичность • Читаемость маркировки
1.3	Тестирование	• HBsAg (ИФА) • Anti-HCV (ИФА) • HIV-1,2 (ИФА/ПЦР)	24-72 ч	• Все тесты отрицательные • Документация
1.4	Карантин	• Температура: $-80 \pm 5^\circ\text{C}$ • Один цикл заморозки	7-14 сут	• Мониторинг t° • Журнал регистрации
ФАЗА II: ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА				
2.1	Размораживание	• Комнатная t° ($20-25^\circ\text{C}$) • Ламинар класса А	2-4 ч	• Полное оттаивание • t° ядра $>0^\circ\text{C}$

Продолжение таблицы 3.1

№	Этап/Операция	Параметры процесса	Время	Контрольные точки
2.2	Удаление тканей	• Скальпель №15 • Костные кусачки	30 мин	• 100% удаление хряща
2.3	Распил	• Осциллирующая или ленточная пила • Форма: блоки, чипсы, крошка	30 мин	• Точность ± 2 мм • t° кости $< 40^\circ\text{C}$
2.4	Первичная H_2O_2	• Концентрация: 3% • Объем: 1:4 • t°: $20-25^\circ\text{C}$ • Смена р-ра через 24 ч	24-48 ч	• pH 6.5-7.5 • Осветление $> 50\%$
ФАЗА III: ЦИКЛИЧЕСКАЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ОЧИСТКА				
<i>3A. Цикл делипидизации (10% NaHCO_3, $40-57^\circ\text{C}$)</i>				
3A.1	Шейкерная баня	• 60-80 колеб./мин • Амплитуда: 20-30 мм • Объем 1:2	20 мин	• Эмульсия жиров • t° $40-57^\circ\text{C}$
3A.2	Промывка №1	• Проточная вода • Давление: 2-3 атм • t°: $20-25^\circ\text{C}$	10-15 мин	• Прозрачность воды • pH 7.0 ± 1.0
3A.3	УЗ-кавитация	• Частота: 22-28 кГц • Мощность: 150-200 Вт • t°: $40-57^\circ\text{C}$	10-20 мин	• Отсутствие пены
3A.4	Промывка №2	• Аналогично 3A.2	10-15 мин	• Аналогично 3A.2
3A.5	Орбитальный шейкер	• 220 об/мин • Радиус: 25 мм • t°: $40-57^\circ\text{C}$	10-20 мин	• Чистый раствор • Нет осадка
3A.6	Промывка №3	• Аналогично 3A.2	10-15 мин	• pH 7.0 ± 0.5
<i>3B. Цикл удаления детрита (дист. вода, $40-57^\circ\text{C}$)</i>				
3B.1-3	Повтор операций A1,3,5	• С дист. водой • Те же параметры	По 45 мин	• Прозрачность р-ра
<i>3C. Цикл окислительной очистки (3% H_2O_2, $40-57^\circ\text{C}$)</i>				
3C.1-3	Повтор операций A1,3,5	• С 3% H_2O_2 • Те же параметры	По 45 мин	• Обесцвечивание кости
3C.4	Финальная отмывка	• Дист. Вода • Орбитальный шейкер	15 мин	• pH 7.0 ± 0.5
<i>3D. Цикл делипидизации и денатурации белков (70% этанол, $40-57^\circ\text{C}$)</i>				
3D.1-3	Повтор операций A1,3,5	• С 70% этанолом • Те же параметры	По 45 мин	• Чистый раствор
3.5	Тройная отмывка	• Дист. вода, $40-57^\circ\text{C}$ • Орбитальный шейкер • 3×15 мин	45 мин	• Чистый раствор (отсутствие помутнения)
ФАЗА IV: СУШКА И ЛИОФИЛИЗАЦИЯ				
4.1	Термосушка	• t°: $45 \pm 2^\circ\text{C}$ • Относит. влажность $< 40\%$	4-24 ч	• Влажность образца $< 20\%$ • Масса стабильна
4.2	Заморозка	• t°: $-80 \pm 5^\circ\text{C}$	≥ 2 ч	• t° в центре -80°C
4.3	Первичная сушка	• t°: -40°C • Вакуум	8 ч	• Потеря массы $> 10\%$

Продолжение таблицы 3.1

№	Этап/Операция	Параметры процесса	Время	Контрольные точки
4.4	Вторичная сушка	• t°: $-40 \rightarrow +40^{\circ}\text{C}$ • Нагрев: $+20^{\circ}\text{C}/8 \text{ ч}$	32 ч	• Влажность: 3-5% • Структура интактна
ФАЗА V: ФИНИШНАЯ ОБРАБОТКА				
5.1	Упаковка	• РЕ пакеты, 2 слоя • Толщина: $\geq 100 \text{ мкм}$ • Радиационно-стойкие	10 мин	• Герметичность швов • Вакуум-тест
5.2	Маркировка	• Этикетка с партией, датой, m	5 мин	• Читаемость
5.3	Стерилизация	• Доза: $20 \pm 5 \text{ кГр}$	30-60 мин	• Отсутствие микробного роста

3.1.2 Оценка морфологии поверхности материала методом сканирующей электронной микроскопии

Проведение сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) образцов материала, подготовленного по оригинальной методике, показало, что трехмерная пористая структура губчатой кости осталась интактной (рисунок 3.2.А). Межтрабекулярные пространства были полностью освобождены от клеточных элементов, жирового костного мозга и другого клеточного детрита. Полное отсутствие включений в межтрабекулярном пространстве и на поверхности трабекул свидетельствует об эффективности многоэтапной отмывки. При большем увеличении (рисунок 3.2.Б) области костных трабекул установлено, что составляющие костно-минеральный матрикс коллагеновые волокна сохранили свою четкую направленность и плотную укладку.

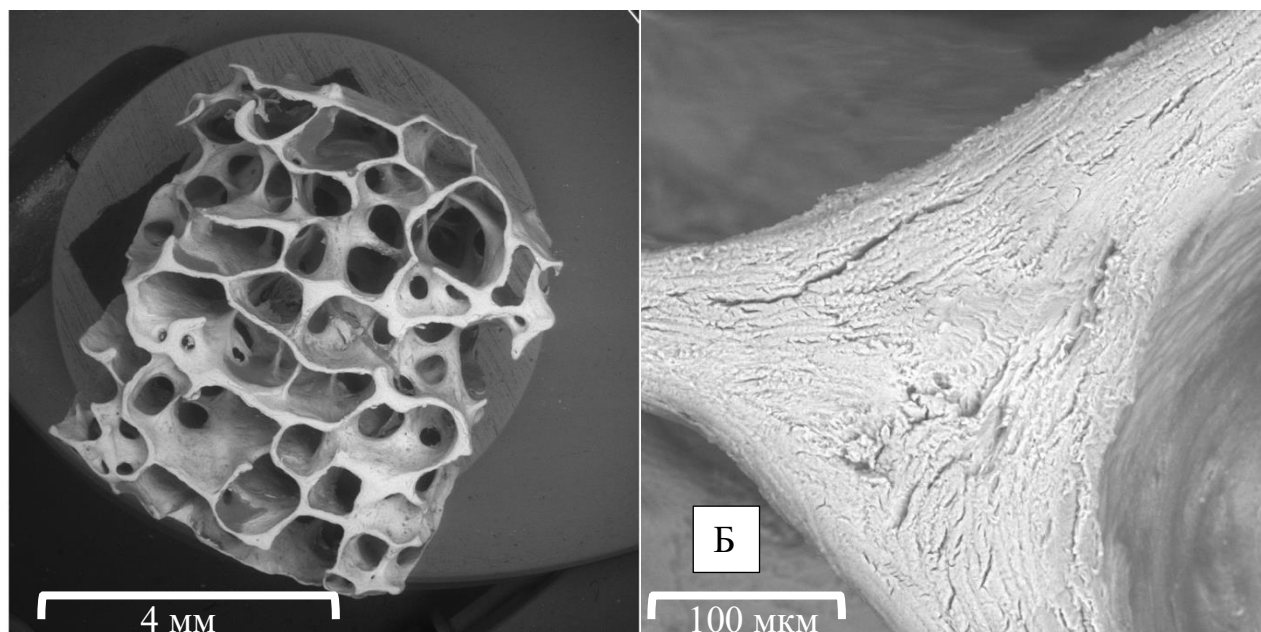


Рисунок 3.2 – Микрофотографии лиофилизированного остеопластического материала, полученного по разработанной методике (СЭМ, напыление золото-палладий):

А – общий вид блока с сохраненной архитектоникой губчатой кости и отсутствием клеточных элементов в межтрабекулярном пространстве;

Б – визуализация четкой направленности и плотности коллагеновых волокон костно-минерального матрикса

3.1.3 Оценка элементного состава материала методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии

Методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) установлено, что основными химическими элементами в составе материала являлись кислород (в среднем 52,53 – 54,67%), кальций (29,19 – 31,86%) и фосфор (14,78 – 15,35%) (таблица 3.2). В незначительных количествах были определены натрий (0,49 – 0,94%) и магний (0,32 – 0,43%). Полученное соотношение основных элементов, в частности кальция и фосфора, соответствовало их соотношению в природном гидроксиапатите, который является основным неорганическим компонентом кости.

Таблица 3.2 – Элементный состав поверхности образцов лиофилизированного остеопластического материала по данным ЭДС, в атомных %

Спектр	O	Na	Mg	P	Ca	Итог
1	54,67	0,94	0,32	14,78	29,28	100,00
2	54,40	0,72	0,34	15,35	29,19	100,00
3	52,53	0,49	0,33	14,79	31,86	100,00
Среднее	53,87	0,72	0,33	14,97	30,11	100,00
Ст. откл.	1,16	0,23	0,01	0,32	1,50	

3.1.4 Оценка стерильности и стабильности материала при хранении

Исследование на стерильность выполняли сразу после изготовления и стерилизации экспериментальных образцов и затем через 6, 12, 18 и 24 месяца (n=5, на каждый срок наблюдения). Образцы хранили в одинаковых условиях при комнатной температуре в защищенном от прямых солнечных лучей месте. На всех контрольных сроках наблюдения роста микроорганизмов ни в одной из исследованных проб зафиксировано не было.

3.2 Оценка биомеханических свойств разработанного остеопластического материала

Стандартизированные образцы губчатой кости из метаэпифиза большеберцовой кости крупного рогатого скота были разделены на три группы: группа 1 – свежзамороженная нативная кость (n=8) в качестве контроля; группа 2 – кость, прошедшая этап химической очистки по разработанной методике (n=13); группа 3 – кость, прошедшая химическую очистку с последующей лиофилизацией (n=11) (таблица 3.3).

Анализ результатов биомеханических испытаний, представленных в таблице 3.3, показал, что предложенная технология обработки не приводит к снижению

прочностных характеристик материала по сравнению с нативной костью. Напротив, после химической очистки наблюдали более чем двукратное увеличение предела прочности, который оставался высоким и после лиофилизации. Статистически значимые изменения были выявлены для модуля упругости ($p = 0,009$) и относительной деформации ($p = 0,007$). Было установлено, что химическая очистка приводила к существенному увеличению жесткости материала, но одновременно и к резкому снижению его пластичности. Последующий этап лиофилизации способствовал восстановлению пластических свойств материала до уровня, сопоставимого с нативной костью, при сохранении прочностных характеристик, превышающих контрольные значения.

Таблица 3.3 – Характеристики исследованных образцов костной ткани, $M \pm m$

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

Примечание: * – различия статистически значимы ($p < 0,05$).

3.3 Оценка биологических характеристик материала в экспериментах *in vitro*

3.3.1 Цитосовместимость материала

Биосовместимость и отсутствие цитотоксичности разработанного материала были подтверждены в экспериментах с использованием культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). Оценка жизнеспособности клеток методом МТТ-теста после 7 дней культивирования непосредственно в костных блоках показала, что уровень жизнеспособности в образцах, изготовленных заявляемым способом ($0,497 \pm 0,207$), был сравним с образцами после стандартной термической стерилизации ($0,601 \pm 0,116$). Это свидетельствовало об отсутствии у разработанного материала токсического влияния на клетки.

3.3.2 Остеоиндуктивный потенциал материала

Способность материала поддерживать и стимулировать остеогенную дифференцировку была оценена на культуре ММСК кролика. После 14 дней культивирования в остеоиндуцирующей среде наблюдали формирование многочисленных минерализованных узелков, которые интенсивно окрашивались ализариновым красным, что свидетельствовало об активном процессе матричной минерализации. Молекулярно-биологический анализ показал многократное увеличение экспрессии генов-ключевых маркеров остеогенеза – костного морфогенетического белка 2 (BMP2) и транскрипционного фактора RUNX2 – по сравнению с контрольными (недифференцированными) клетками (рисунок 3.3.). Совокупность этих данных подтвердила наличие у разработанного материала выраженного остеоиндуктивного потенциала.

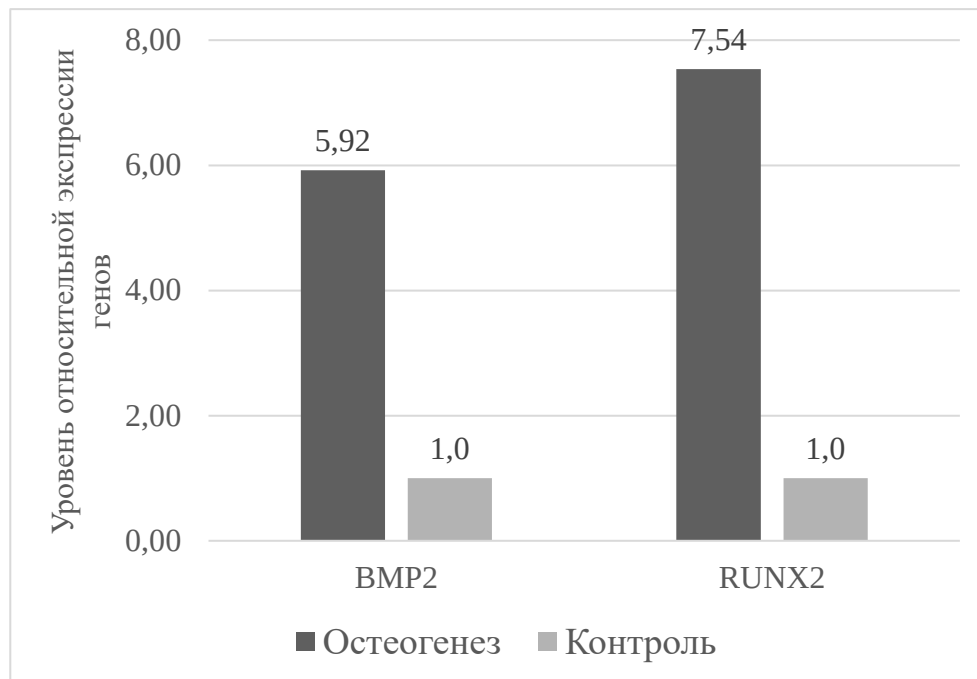


Рисунок 3.3 – Уровень экспрессии генов BMP2 и RUNX2 в ММСК кролика после остеогенеза в течение 14 дней по отношению к контрольным (недифференцированным) клеткам

3.3.3 Сравнительная оценка перифокальных тканевых реакций в эксперименте *in vivo*

Для изучения процессов остеоинтеграции и ремоделирования разработанного материала была проведена серия экспериментов на 18 кроликах породы Советская шиншилла с моделированием асептического полостного дефекта большеберцовой кости. Животные были разделены на экспериментальную группу, где дефект заполняли оригинальным лиофилизированным материалом без дополнительного насыщения, и контрольную группу, где для пластики дефекта использовалась свежемороженая аллогенная кость. Животных выводили из эксперимента на 14, 45 и 90 сутки и выполняли гистологические исследования области замещенного дефекта.

3.3.3.1 Результаты гистологического исследования

При проведении микроскопии гистологических стекол установлены существенные различия между экспериментальной и контрольной группами на всех сроках наблюдения.

К 14-м суткам в экспериментальной группе были зафиксированы отчетливые признаки остеокондуктивного костеобразования. На поверхности фрагментов разработанного материала визуализировались узкие полосы и наслоения новообразованного остеоида, что свидетельствовало об активном процессе формирования костной ткани (рисунок 3.4.А). В контрольной группе на этом же сроке динамика была иной: грануляционная ткань созревала в плотную фиброзную ткань, которая инкапсулировала костные фрагменты, полностью изолируя их от окружающих тканей (рисунок 3.4.Б). Явления остеогенеза по-прежнему отсутствовали.

На 45-е сутки в экспериментальной группе наблюдалось созревание молодой костной ткани в пластинчатую, однако не во всех наблюдениях было достигнуто полное восстановление непрерывности кортикальной пластинки (рисунок 3.4.В). В контрольной группе на этом сроке признаков остеогенеза не было выявлено, а костные фрагменты оставались инкапсулированными плотной фиброзной тканью, что значительно замедляло их резорбцию (рисунок 3.4.Г).

К 90-м суткам в экспериментальной группе отмечали практически полное ремоделирование костного дефекта с формированием зрелой пластинчатой кости и костномозгового канала, заполненного кроветворным костным мозгом. Встречались лишь единичные, частично резорбированные фрагменты имплантата (рисунок 3.4.Д). В контрольной группе на финальном сроке наблюдения целостность кортикальной пластинки не восстанавливалась. Ее края в области дефекта были закруглены, что свидетельствовало о формировании стойкого несращения (рисунок 3.4.Е).

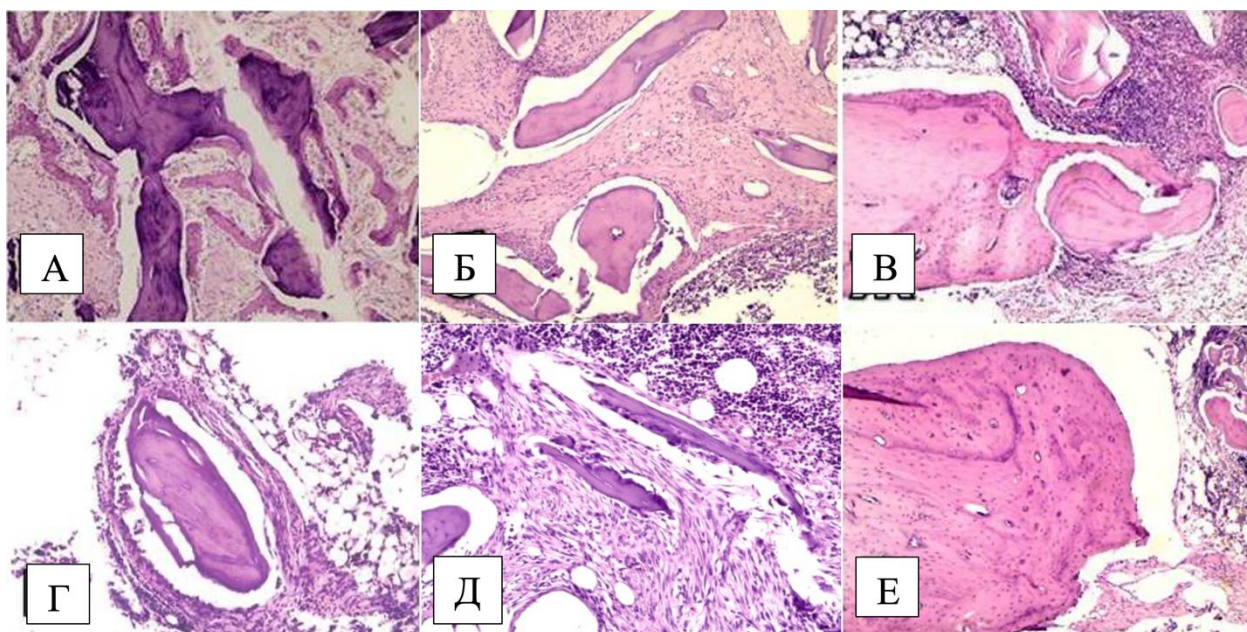


Рисунок 3.4 – Динамика гистологических изменений в области костного дефекта большеберцовой кости кроликов. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 100$:

Экспериментальная группа (оригинальный лиофилизированный материал): А – 14-е сутки: формирование остеоида на поверхности фрагментов материала; В – 45-е сутки: созревание костной ткани, неполное восстановление кортикальной пластинки; Д – 90-е сутки: ремоделирование дефекта с формированием зрелой кости.

Контрольная группа (свежезамороженная кость): Б – 14-е сутки: инкапсуляция костных фрагментов фиброзной тканью; Г – 45-е сутки: сохраняющаяся инкапсуляция костных фрагментов; Е – 90-е сутки: стойкое несращение дефекта с закруглением краев кортикальной пластинки

3.3.3.2 Результаты рентгенологического исследования

На контрольных рентгенограммах, выполненных на 1-е сутки после операции, в обеих группах костный дефект имел ровные, четкие контуры и был равномерно заполнен имплантированным материалом (рисунок 3.5.А-Б).

При анализе рентгенограмм на **90-е сутки** в экспериментальной группе, где применяли оригинальный лиофилизированный материал, была отмечена выраженная положительная динамика. Зона дефекта кортикальной пластинки существенно уменьшилась в размерах, а имплантированный материал подвергся значительной резорбции и интеграции с окружающей костью. Края кортикальных

пластинок в зоне дефекта были сглажены, что свидетельствовало об активных процессах ремоделирования и перестройки (рисунок 3.5.В). В контрольной группе на 90-е сутки рентгенологическая картина была принципиально иной. Отмечалась субтотальная резорбция имплантированного материала без признаков его замещения новообразованной костной тканью. Дефект кортикальной пластинки сохранялся, уменьшившись в диаметре менее чем наполовину, и имел стертые, нечеткие границы, что указывало на отсутствие полноценного костного сращения (рисунок 3.5.Г).



Рисунок 3.5 – Рентгенограммы большеберцовой кости кроликов в боковой проекции в динамике:

А – 1-е сутки после замещения дефекта оригинальным лиофилизированным материалом

Б – 1-е сутки после замещения дефекта свежемороженой костью

В – 90-е сутки после замещения дефекта оригинальным лиофилизированным материалом, отмечается интеграция имплантата

Г – 90-е сутки после замещения дефекта свежемороженой костью, отмечается резорбция материала и отсутствие замещения дефекта

3.4 Резюме

В ходе проведенного исследования был разработан и стандартизирован комплексный многоэтапный протокол получения оригинального лиофилизированного остеопластического материала. Результаты физико-химического анализа подтвердили, что предложенный способ обработки позволяет эффективно удалять все клеточные и жировые компоненты, сохраняя при этом нативную трехмерную архитектуру и минеральный состав костного матрикса.

Исследования *in vitro* продемонстрировали высокую биосовместимость материала, отсутствие у него цитотоксических свойств, а также выраженный остеоиндуктивный потенциал, что подтверждалось способностью материала поддерживать остеогенную дифференцировку мезенхимальных стромальных клеток. Установлено также, что разработанный материал по сравнению с нативной костью характеризовался большей прочностью и жесткостью при сохранении сопоставимого уровня пластичности.

Результаты экспериментального исследования *in vivo* на модели асептического дефекта у кроликов убедительно продемонстрировали значительные преимущества разработанного материала над стандартным свежемороженом аллотрансплантатом. Гистологические и рентгенологические данные свидетельствовали о последовательном ремоделировании имплантата, которое характеризовалось формированием новообразованной костной ткани непосредственно на его поверхности и постепенным замещением материала костью реципиента.

Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствует о высоком регенераторном потенциале разработанного материала и обосновывает его перспективность для применения в костно-пластической хирургии.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА СПОСОБА ИМПРЕГНАЦИИ И ОСОБЕННОСТИ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ РАЗРАБОТАННОГО ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА С АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Основной задачей настоящего этапа исследования стала разработка и оптимизация методики импрегнации оригинального костнопластического материала антибиотиком ванкомицином. В данной главе представлены результаты изучения влияния на эффективность насыщения костного материала ключевых технологических параметров: давления, время экспозиции и состава растворителя. Оценка эффективности включала определение продолжительности и интенсивности антимикробной активности *in vitro* в отношении MRSA бактериологическими методами, а также изучение фармакокинетических характеристик высвобождения ванкомицина из образцов с использованием метода ВЖХ и последующего статистического анализа. Полученные результаты позволили выбрать оптимальный протокол для получения материала, способного контролировать воспалительный процесс и поддерживать репаративные процессы. Что было изучено в эксперименте *in vivo* на модели хронического остеомиелита.

4.1 Сравнительный анализ эффективности различных методик импрегнации костного материала антибиотиком

Исследование было основано на изучении семи различных по технологическим параметрам методик, включающих импрегнацию:

- 1 – в водном растворе при атмосферном давлении в течение 60 минут,
- 2 – аналогично, но в течение 24 часов,
- 3 – в водном растворе при пониженном давлении (7-10 hPa) в течение 5 минут
- 4 – аналогично, но 60 минут
- 5 – аналогично, но 24 часов
- 6 – в 50% растворе этанола при пониженном давлении в течение 60 минут,

7 – аналогично, но с добавлением 5% ПВП.

Установлено, что в 1-е сутки все образцы, полученные разными методиками импрегнации, продемонстрировали сопоставимую антибактериальную активность с зонами подавления роста MRSA в диапазоне 20,7-24,7 мм (таблица 4.1). Со вторых суток образцы, импрегнированные в водном растворе при атмосферном давлении (методики 1 и 2), начали значительно снижать свою антимикробную активность, в то время как образцы, обработанные в условиях вакуума, особенно с использованием спиртовых растворов (методики 6 и 7), сохраняли стабильную активность в течение более длительного периода

Таблица 4.1 – Динамика диаметра зон подавления роста MRSA в группах образцов (n=3), импрегнированных разными методиками, $M \pm SD$, мм

Сутки	Методика импрегнации						
	1	2	3	4	5	6	7
1	22,0 $\pm$ 0,0	21,7 $\pm$ 0,6	24,0 $\pm$ 0,0	23,3 $\pm$ 1,6	24,7 $\pm$ 0,6	20,7 $\pm$ 0,6	22,3 $\pm$ 1,2
2	16,7 $\pm$ 2,3	18,3 $\pm$ 0,6	20,0 $\pm$ 0,0	20,7 $\pm$ 0,6	20,7 $\pm$ 0,6	20,7 $\pm$ 0,6	22,3 $\pm$ 1,2
3	15,3 $\pm$ 0,6	16,0 $\pm$ 1,7	16,3 $\pm$ 1,2	16,7 $\pm$ 0,6	15,3 $\pm$ 1,5	15,3 $\pm$ 0,6	22,0 $\pm$ 0,6
4	9,0 $\pm$ 0,0	12,7 $\pm$ 1,2	14,0 $\pm$ 3,5	14,0 $\pm$ 3,6	16,7 $\pm$ 1,5	15,7 $\pm$ 2,5	16,7 $\pm$ 1,5
7	н/д*	н/д	12,0 $\pm$ 0,0	13,3 $\pm$ 1,2	15,3 $\pm$ 1,2	15,3 $\pm$ 1,2	16,0 $\pm$ 0,0
8	н/д	н/д	8,0 $\pm$ 0,0	8,7 $\pm$ 0,6	13,3 $\pm$ 1,2	13,7 $\pm$ 0,6	15,0 $\pm$ 1,0
9	н/д	н/д	н/д	8,0 $\pm$ 0,0	9,3 $\pm$ 2,3	11,7 $\pm$ 2,5	13,0 $\pm$ 13,0
10	н/д	н/д	н/д	н/д	9,0 $\pm$ 0,0	8,7 $\pm$ 0,6	10,7 $\pm$ 2,3
11	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	5,3 $\pm$ 4,6	8,0 $\pm$ 0,0
14	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	8,0 $\pm$ 0,0

Примечание здесь и в табл. 4: * - н/д - значения ниже предела обнаружения метода (0.0 $\pm$ 0.0)

Методики 1 и 2 с применением водного раствора антибиотика вне зависимости от времени импрегнации при атмосферном давлении были наименее эффективными ($F = 4.8192$, $p = 0.0001$). Насыщение образцов в водном растворе АБ в условиях отрицательного давления также не привело к значимому продлению их антистафилококковой активности. Значимо более эффективной в сравнении с методиками 1 и 2 была импрегнация в спиртовом растворе АБ в условиях вакуума ($p = 0.0283$ и 0.05). При этом увеличение времени импрегнации в методиках 3, 4 и 5 не позволило существенно пролонгировать АМА образцов ($p > 0,05$ при попарных сравнениях). Однако, статистический анализ динамики диаметров зон подавления роста MRSA показал, что длительность АМА для образцов, импрегнированных методиками 5, 6 и 7 статистически значимо превосходили методику 1, кроме того, методика 7 была значимо лучше методики 2 (рисунок 4.1).

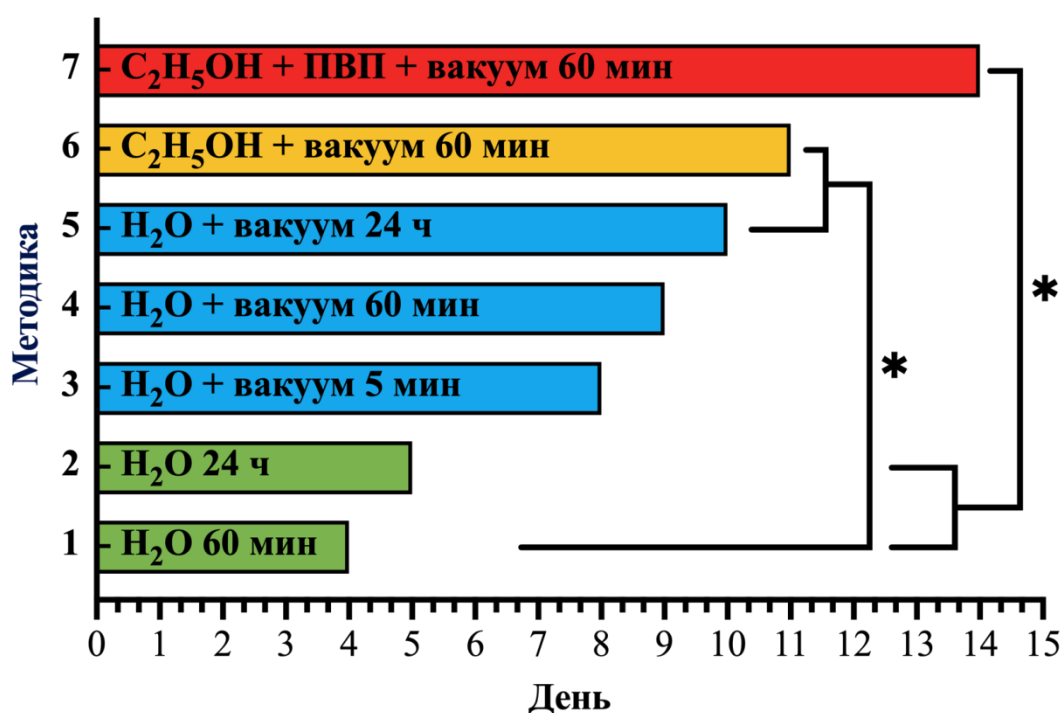


Рисунок 4.1 – Длительность антимикробной активности *in vitro* образцов с различными способами импрегнации

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

Установлено, что все исследованные параметры статистически значимо влияли на продолжительность процесса импрегнации, при этом наибольшее влияние оказывало давление ($F = 19.9916$, $p < 0.0001$), за ним следовали тип используемого растворителя ($F = 7.7485$, $p = 0.0006$) и время импрегнации ($F = 6.8084$, $p = 0.0014$).

4.2 Фармакокинетические характеристики высвобождения ванкомицина из образцов оригинального костнопластического материала

При анализе результатов по оценке элюции ванкомицина методом ВЭЖХ также были выявлены существенные различия между исследуемыми методиками импрегнации (таблица 4.2). Длительность эффективной элюции варьировала от 4 до 14 дней, при этом наименьшее суммарное количество ванкомицина, выделялось из образцов, импрегнированных по методике 1 с применением водного раствора и атмосферного давления, а наибольшее – из образцов, насыщенных в спиртовом растворе с полимером в условиях вакуума (методика 7).

Установлено, что увеличение времени импрегнации в водном растворе антибиотика при атмосферном давлении с 60 мин до 24 часов статистически значимо увеличило концентрацию ванкомицина в инкубационном растворе на протяжении всего периода наблюдения ($p < 0.05$). Наиболее выраженные различия отмечались на второй и четвертый дни исследования ($p = 0.0000$).

Увеличение времени насыщения образцов в водном растворе в условиях вакуума с 5 до 60 мин не показало значительных различий в концентрации антибиотика выделенной в 1 сутки ($p > 0,05$), при этом на 2-3 сутки элюированная концентрация ванкомицина из образцов изготовленных по методике 4 была в 1,4 - 1,8 раза выше, чем по методике 3 ($p = 0.0001$). Аналогичная тенденция была выявлена при анализе влияния давления на интенсивность выхода антибиотика. Образцы, насыщенные методиками 1 и 4 не показали значимых различий по выходу ванкомицина в первые сутки ($p = 0.2479$), однако начиная со второго дня различия

в концентрации антибиотика в инкубационном растворе были статистически значимыми ($p = 0.0000$). В то же время увеличение времени импрегнации образцов в водном растворе в вакууме до 24 часов (методика 5) показало наибольшую для методик 1-5 эффективность насыщения, как по продолжительности элюции ванкомицина, так и по его концентрации ($p < 0,05$).

60-минутная импрегнация в спиртовом растворе антибиотика (методика 6) в условиях вакуума была сопоставима с 24-часовым насыщением в водном растворе (методика 5) ($p > 0,05$), как в отношении продолжительности элюции ванкомицина, так и суммарной массе вышедшего антибиотика. Добавление полимера в спиртовой раствор антибиотика (методика 7) обеспечило максимальную длительность элюции (14 дней) и максимальную сумму вышедшего антибиотика среди изученных методик.

Площадь под кривой элюции (AUC) существенно различалась в зависимости от методики импрегнации. Минимальное значение AUC было зафиксировано при применении методики 1 (13108,00), а максимальное значение – при использовании методики №7 (301364,70), что в 23 раза больше, чем для методики 1 и в 5 раз - для методики 6.

Таблица 4.2 – Динамика концентрации ванкомицина в инкубационном растворе с образцами (n=3), импрегнированными различными способами. М ± SD, мкг/мл

Сутки	Методика импрегнации						
	1	2	3	4	5	6	7
1	23658 ± 1183	18747 ± 938	21551 ± 1078	25001 ± 1250	65258 ± 3263	44679 ± 2234	82755 ± 2069
2	258 ± 13	3234 ± 162	4287 ± 215	7839 ± 392	17894 ± 895	17516 ± 876	99578 ± 4979
3	574 ± 29	1234 ± 62	1852 ± 92	2816 ± 141	4648 ± 233	5791 ± 287	92877 ± 4644
4	447 ± 3	246 ± 13	1554 ± 75	1755 ± 88	3780 ± 189	5260 ± 263	45621 ± 2281
5	н/д*	36 ± 2	1354 ± 68	489 ± 25	1957 ± 98	3649 ± 183	9658 ± 483
6	н/д	н/д	823 ± 41	546 ± 28	933 ± 47	2846 ± 143	5710 ± 286
7	н/д	н/д	450 ± 23	480 ± 24	784 ± 39	1120 ± 56	3903 ± 195
8	н/д	н/д	129 ± 7	238 ± 12	417 ± 21	490 ± 25	1244 ± 62
9	н/д	н/д	н/д	38,1 ± 2.0	236,1 ± 12.0	166,9 ± 8.0	987 ± 50
10	н/д	н/д	н/д	н/д	45,0 ± 2.3	69,0 ± 3.5	259 ± 13
11	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	43,0 ± 3.4	54,1 ± 2.7
14	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	27,9 ± 1.4
СВ	24937±1183,5	23497±954,8	32000±1112,6	39202.1±1314,8	95952.1±3384,9	81629.9±2414,8	342674±7507,3

Примечание: Суммарное высвобождение (СВ) рассчитано как сумма средних значений за весь период наблюдения, мкг

Корреляционный анализ выявил сильную положительную связь между концентрацией ванкомицина в инкубационной жидкости и диаметром зоны подавления роста бактерий для всех исследованных методик импрегнации. Коэффициенты корреляции Спирмена варьировали от 0,723 до 0,908, при этом для методик 3-7 связь была статистически значимой ($p < 0,05$ для методик 4-7; $p = 0,058$ для методики 3), а наиболее выраженная корреляция наблюдалась в группе 7 ($r = 0,908$; $p < 0,001$). Даже для методик 1 и 2, где статистическая значимость не была достигнута, коэффициенты корреляции оставались высокими (0,777 и 0,870 соответственно). Установленная сильная монотонная связь между концентрацией антибиотика и антимикробной активностью позволяет использовать бактериологический метод определения зон подавления роста как надежную альтернативу для оценки элюции ванкомицина из импрегнированных образцов в условиях, когда проведение количественного анализа методами высокоэффективной жидкостной хроматографии или спектрофотометрии невозможно или нецелесообразно.

Кинетика элюции ванкомицина из импрегнированных образцов для большинства методик хорошо описывалась экспоненциальной моделью $C(t) = C_0 \times e^{(-kt)}$, что подтверждается высокими значениями коэффициента детерминации ($R^2 > 0,91$ для групп 2-7). Наилучшее соответствие модели продемонстрировала группа 2 ($R^2 = 0,990$) с наиболее быстрым убыванием концентрации ($k = -1,509$), в то время как группы 3-7 характеризовались более пологими кривыми элюции (k от -0,591 до -0,778), что указывает на более продолжительное высвобождение антибиотика. Установленная экспоненциальная зависимость позволила рассчитать площадь под фармакокинетической кривой (AUC_{0-14}) как интегральный показатель, отражающий суммарную экспозицию антибиотика за весь период наблюдения. Значения AUC в совокупности с динамикой концентраций и продолжительностью антимикробной активности дают комплексную оценку терапевтического потенциала каждой методики импрегнации (рисунки 4.2 и 4.3)

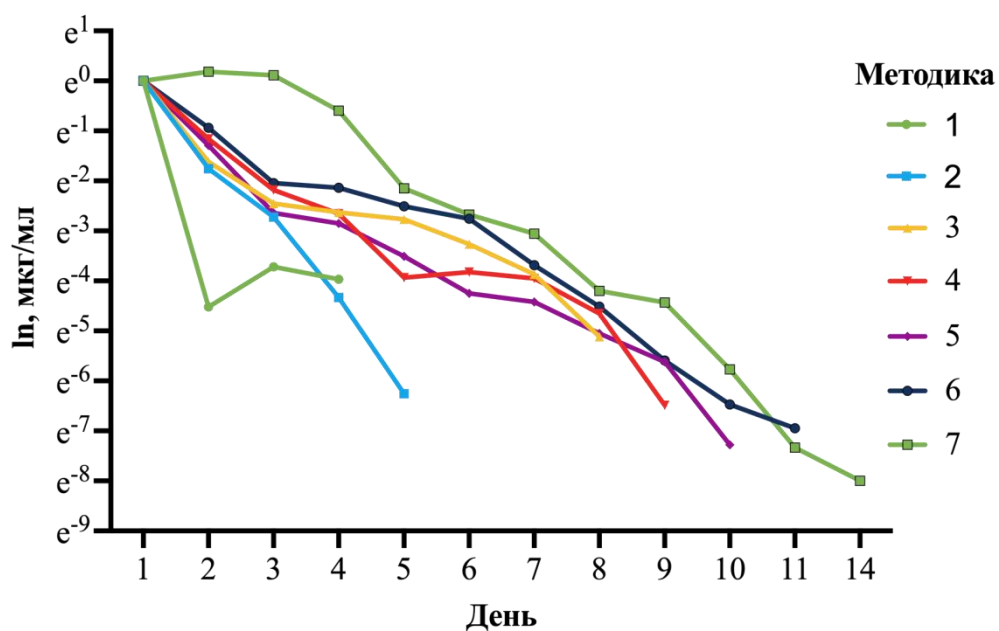


Рисунок 4.2 – Динамика элюции ванкомицина из образцов, импрегнированных различными методиками, ln (концентрация ванкомицина, мкг/мл)

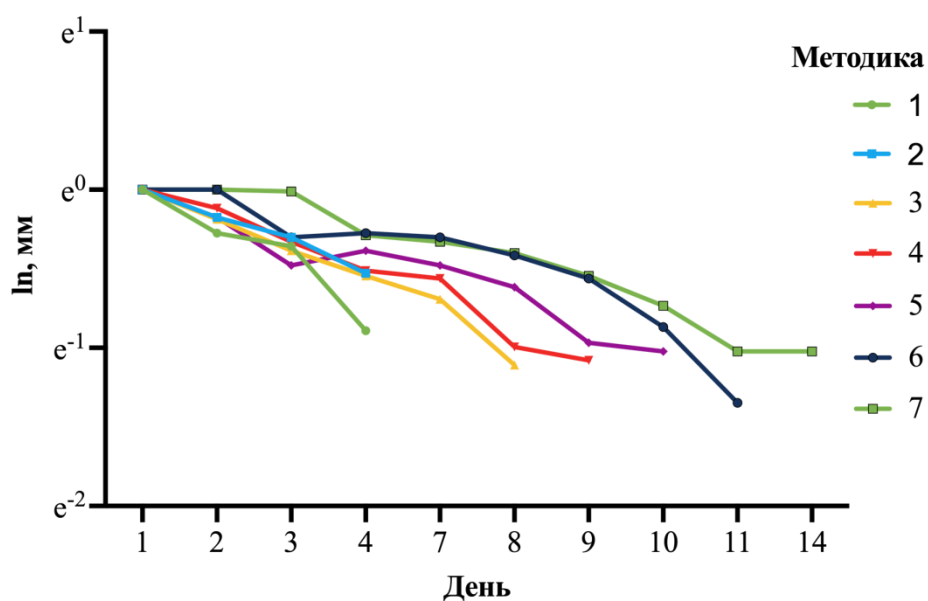


Рисунок 4.3 – Динамика изменений зон подавления (мм) роста *S. aureus* (MRSA), ln (диаметр зоны подавления роста, мм)

Проведенный сравнительный анализ методик импрегнации и фармакокинетики высвобождения ванкомицина показал, что оптимальной является

методика 7 (вакуумная импрегнация в 50% этаноле с добавлением 5% ПВП): она обеспечила наибольшую продолжительность антимикробной активности против MRSA (до 14 суток), максимальное суммарное высвобождение и AUC. На эффективность наибольшее влияние оказывало давление, затем тип растворителя и время экспозиции. Совокупность полученных данных позволила оформить заявку и получить патент RU 2839413 C1 «Способ импрегнации пористых материалов антибактериальными препаратами для одномоментного замещения остеомиелитических дефектов и создания депо антимикробных препаратов». Все последующие эксперименты, включая *in vivo* на модели хронического остеомиелита, выполнены с образцами, подготовленными по методике 7.

4.3 Стабильность антимикробных свойств и стерильности разрабатываемого материала при длительном хранении

Результаты исследования стерильности костных блоков, импрегнированных ванкомицином, показали отсутствие бактериального роста во всех образцах на протяжении всего периода наблюдения (24 мес.). При первичном тестировании согласно ISO 11737-2 не было выявлено помутнения тиогликолевой среды после 14-дневной инкубации при температуре (30 ± 2) °C. Контрольные высевы на плотные питательные среды также не выявили роста микроорганизмов после 24-часовой инкубации при 37°C.

Наблюдение за стерильностью материала продемонстрировало сохранение стерильности всех тестируемых образцов на всех контрольных точках исследования: через 6, 12, 18 и 24 месяца хранения в стандартных условиях (при комнатной температуре, без воздействия прямых солнечных лучей).

На сроках 6, 12 и 18 месяцев после изготовления и стерилизации АМА образцов, изготовленных по методике 7, оставалась стабильной. Диаметр зоны подавления роста MRSA через 6 месяцев, $22,0 \pm 1,0$ мм через 12 месяцев и $21,8 \pm 1,1$ мм через 18 месяцев был сопоставим с аналогичным показателем на 1-е сутки

после импрегнации – $22,3 \pm 1,2$ мм ($p > 0,05$). Длительность элюции антибиотика также сохранялась на уровне 14 дней на этих сроках хранения.

Через 24 месяца хранения было зафиксировано значительное снижение АМА. Диаметр зоны подавления роста MRSA через сутки от начала исследования был значимо меньше исходных значений соответственно $15,5 \pm 1,5$ мм и $22,3 \pm 1,2$ мм ($p < 0,001$), а длительность элюции сократилась до 4 дней (против 14 дней изначально, $p < 0,001$).

4.4 Сравнительная оценка эффективности остеопластических материалов в условиях хронического остеомиелита

Для сравнительной оценки регенераторного потенциала разработанного материала в условиях инфекционного процесса было проведено исследование *in vivo* на 18 кроликах с моделью хронического остеомиелита большеберцовой кости. После хирургической санации очага животным основной группы (группа 2О, $n=9$) дефект замещали оригинальным лиофилизированным материалом, импрегнированным ванкомицином. Животным группы сравнения (группа 2С, $n=9$) дефект замещали коммерческим материалом на основе β -ТКФ/ГА (ReproBone®), смешанным *ex tempore* с ванкомицином. Животных выводили из эксперимента на 14, 45 и 90 сутки и выполняли микробиологические и гистологические исследования области замещенного дефекта.

4.4.1 Результаты микробиологического исследования

По результатам микробиологического исследования тканевых биоптатов, взятых из области дефекта, на 14, 45 и 90 сутки после операции роста искомого штамма *S. aureus* не было выявлено ни в одной из групп. Это свидетельствует об эффективности санации остеомиелитического очага и достаточной локальной

антибактериальной активности используемого остеозамещающего материала с ванкомицином в обеих группах.

4.4.2 Результаты гистологического и морфометрического анализа

Гистологическое исследование выявило различия в характере и динамике тканевых реакций между основной группой и группой сравнения на всех сроках наблюдения.

На 14-е сутки в основной группе (2O) гистологическая картина характеризовалась выраженной, но контролируемой воспалительной реакцией. В области дефекта определялись некротизированные костные балки имплантата, окруженные рыхлой соединительной тканью с лимфоцитарной инфильтрацией и признаками активного неоангиогенеза (рисунок 4.4.A). На поверхности большинства трабекул визуализировались многочисленные активные остеокласты, осуществлявшие лакунарную резорбцию. Одновременно на отдельных участках отмечалось появление остеобластов и формирование первичного остеоида. В группе сравнения (2C) на этом же сроке в центре дефекта визуализировались скопления гранул материала с признаками остеогенеза на их поверхности, однако костные балки формировались преимущественно вокруг гранул материала, а межтрабекулярные пространства были заполнены красным костным мозгом с примесью жирового (рисунок 4.4.B).

К 45-м суткам в основной группе (2O) дефект был замещен преимущественно волокнистой соединительной тканью с сохранением крупных некротизированных костных балок, окруженных остеокластами (рисунок 4.4.B). Воспалительная инфильтрация становилась менее интенсивной. Новообразование костной ткани происходило преимущественно со стороны костномозгового канала, а ее матрикс демонстрировал признаки начальной минерализации. В группе сравнения (2C) на этом сроке также отсутствовали признаки активного инфекционного процесса, на поверхности гранул располагались остеобласты, образующие остеоид, что

свидетельствовало о продолжающемся остеогенезе (рисунок 4.4.Г). В обеих группах было отмечено формирование непрерывной кортикальной пластинки.

К 90-м суткам в обеих группах наблюдалась органотипическая перестройка в зоне дефекта. В основной группе (2О) отмечалось активное формирование новообразованных костных балок, которые "обрастали" некротизированные фрагменты имплантата (рисунок 4.4.Д), гистологически определялась лишь слабо выраженная очаговая лимфоцитарная инфильтрация. Морфологическая картина в группе сравнения (2С) была схожей, количество фиброзной ткани уменьшилось в сравнении с предыдущим сроком (рисунок 4.4.Е).

Сравнительный анализ морфометрических показателей на 45-е и 90-е сутки не выявил статистически значимых различий между основной группой (2О) и группой сравнения (2С) по относительным площадям, занимаемым новообразованной костной тканью, фиброзной тканью и остаточным материалом ($p > 0,05$). Это свидетельствует о сопоставимом объеме тканевой перестройки при использовании обоих материалов в указанные сроки.

Детальный анализ динамики клеточных и тканевых процессов в основной группе (2О) позволил выявить три последовательные фазы регенерации (таблица 4.3.).

Ранняя фаза (14-е сутки) характеризовалась выраженной воспалительной реакцией. Относительная площадь воспаления (Inf.Ar/T.Ar) была максимальной и составляла 78,19%. Высокая доля некротизированной костной ткани имплантата (относительный периметр Nc.B.Pm/V.Pm 57,31%) прямо коррелировала с выраженностью воспаления ($r = 0,439$; $p < 0,001$). На данном этапе преобладала резорбтивная активность: относительный периметр, занятый остеокластами (Oc.Pm/V.Pm), составлял 4,39%, в то время как остеобластическая активность только начиналась (Ob.Pm/V.Pm 3,99%).

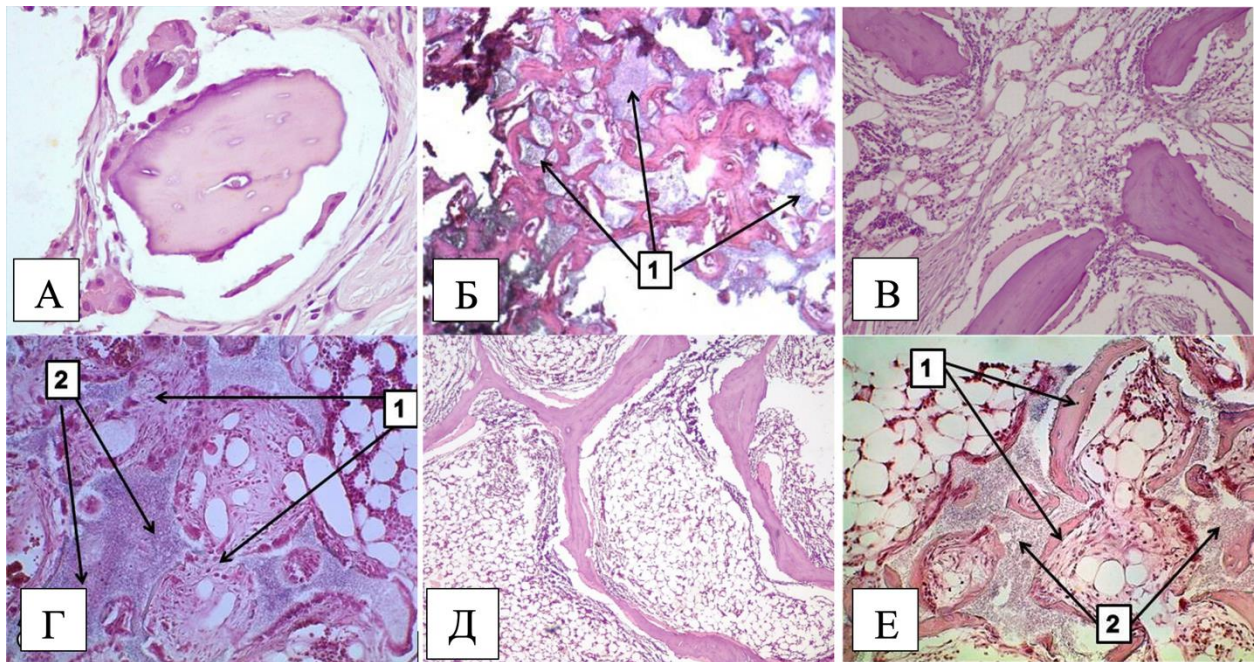


Рисунок 4.4 – Сравнительная гистологическая картина ремоделирования в области инфицированного костного дефекта на различных сроках наблюдения. Окраска гематоксилином и эозином.

Основная группа (оригинальный материал + ванкомицин):

А – 14-е сутки: формирование первичного остеоида на поверхности некротизированной костной балки имплантата (ув. $\times 400$)

В – 45-е сутки: волокнистая соединительная ткань с лимфоцитарной инфильтрацией и новообразованными костными балками (ув. $\times 100$)

Д – 90-е сутки: формирование новообразованных костных балок, «обрастающих» некротизированные фрагменты имплантата (ув. $\times 100$)

Группа сравнения (β -ТКФ/ГА + ванкомицин):

Б – 14-е сутки: скопления гранул материала с признаками остеогенеза на их поверхности (ув. $\times 200$)

Г – 45-е сутки: активный остеогенез на поверхности гранул материала и формирование непрерывной кортикальной пластинки (ув. $\times 100$)

Е – 90-е сутки: органотипическая перестройка в зоне дефекта с остаточными частицами материала (ув. $\times 200$)

Промежуточная фаза (45-е сутки) демонстрировала ключевые признаки активной репарации. Было зафиксировано снижение относительной площади воспаления до 63,03%. На фоне стабильного уровня остеокластической активности (4,29%) наблюдалось двукратное нарастание остеобластической активности (Ob.Pm/V.Pm 7,95%), что свидетельствовало о смещении баланса в сторону костеобразования.

Поздняя фаза (90-е сутки) отражала переход к активному ремоделированию. Площадь воспаления статистически значимо снизилась до 32,6% ($p < 0,001$ в сравнении с 14-ми сутками). Остеобластическая активность достигла своего пика (11,37%), статистически значимо превышая исходный уровень ($p = 0,016$), в то время как активность остеокластов снизилась до 3,21%. Была установлена сильная обратная корреляция между выраженностью остеобластической активности и площадью воспаления ($r = -0,275$; $p = 0,009$), а также площадью некротизированной кости ($r = -0,514$; $p < 0,001$), что подтверждает ключевую роль подавления воспаления для активации остеогенеза.

Таблица 4.3 – Динамика относительных морфометрических показателей в основной группе (оригинальный материал + ванкомицин), (%)

Показатель	14 дней	45 дней	90 дней	Уравнение регрессии	R ²
Inf.Ar/T.Ar (%)	78,19	63,03	32,65	$y = 87,99 - 0,605x$	0,993
Ос.Pm/B.Pm (%)	4,39	4,29	3,21	$y = 4,28 + 0,0122x - 0,000266x^2$	1,000
Ob.Pm/B.Pm (%)	3,99	7,95	11,37	$y = 3,02 + 0,096x$	0,978
Nc.B.Pm/B.Pm (%)	57,31	50,31	34,59	$y = 62,43 - 0,303x$	0,988

4.5 Резюме

В ходе сравнительного анализа семи различных методик импрегнации оригинального остеопластического материала ванкомицином было установлено, что ключевыми факторами, определяющими эффективность насыщения и продолжительность антимикробной активности, являются давление, состав растворителя и время экспозиции.

Наилучшие результаты по продолжительности антимикробной активности (*in vitro* до 14 суток) и фармакокинетическим характеристикам (максимальное суммарное высвобождение и наибольшая площадь под кривой) были достигнуты

при использовании методики 7, которая включала импрегнацию в условиях пониженного давления (вакуума) в 50% растворе этанола с добавлением 5% поливинилпирролидона. Данные результаты легли в основу заявки на изобретение способа импрегнации, на которую был получен патент RU 2839413 C1 «Способ импрегнации пористых материалов антибактериальными препаратами для одномоментного замещения остеомиелитических дефектов и создания депо антимикробных препаратов».

Разработанный импрегнированный ванкомицином остеопластический материал продемонстрировал сохранение стерильности на протяжении всего 24-месячного периода наблюдения. Антимикробная активность и пролонгированность элюции оставались стабильными в течение 18 месяцев, однако было зафиксировано их статистически значимое снижение к 24-му месяцу хранения, что позволило определить оптимальный срок годности материала в 18 месяцев.

Применение импрегнированного ванкомицином по оптимальной методике оригинального материала в эксперименте *in vivo* на модели хронического остеомиелита показало высокую терапевтическую эффективность разработки. Была достигнута полная санация инфекционного очага во всех случаях, что подтверждено отсутствием роста *S. aureus* во всех временных точках.

Гистоморфометрический анализ выявил физиологическое течение репаративных процессов при использовании разработанного материала: прогрессивное и статистически значимое снижение воспалительной реакции ($p = 0,002$), сбалансированную активность остеокластов и последовательное нарастание остеогенеза, достигавшее пика к 90-м суткам ($p = 0,042$).

Таким образом, в ходе работы был разработан способ импрегнации пористых материалов и создан остеопластический материал, обладающий двойным действием: пролонгированной антимикробной активностью, достаточной для эрадикации инфекции, и выраженным регенераторным потенциалом, обеспечивающим эффективное замещение костного дефекта в условиях хронического остеомиелита.

ГЛАВА 5. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИМПРЕГНИРОВАННЫХ ВАНКОМИЦИНОМ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ

В настоящей главе представлены результаты сравнительного анализа клинической эффективности реконструктивного этапа лечения хронического остеомиелита у 50 пациентов. Всем включенным в исследование пациентам ранее был выполнен saniрующий этап лечения остеомиелита с замещением дефекта антимикробным цементным спейсером в виде бус, дополнительно импрегнированный ванкомицином. Интервал между saniрующим и реконструктивным этапами статистически значимо не различался между группами ($p = 0,522$) и составил в основной группе 140,0 дней (МКИ 92,0–261,0), а в группе сравнения – 194,0 дня (МКИ 111,0–275,0). На момент включения в исследования признаки инфекционно-воспалительного процесса у них отсутствовали. Интраоперационно после удаления КЦ выполняли повторную РХООО. Сформированный костный дефект замещали пациентам основной группы ($n=25$) оригинальный остеопластический материал, импрегнированный ванкомицином, в группе сравнения ($n=25$) – биокompозитный материал на основе β -ТКФ/ГА с добавлением ванкомицина. В главе последовательно проведен анализ интра- и послеоперационных показателей второго этапа лечения, оценена динамика лабораторных маркеров воспаления, изучена локальная фармакокинетика антибиотика, а также представлены микробиологические результаты и клинические исходы в виде частоты рецидивов инфекционного процесса. Средние сроки наблюдения составили 2,4 года (МКИ 1,875–3,125) – для группы сравнения и 2,2 года (МКИ 1,95–2,78) для основной группы.

5.1 Интра- и послеоперационные показатели второго этапа лечения

При сравнении интраоперационных характеристик второго этапа хирургического лечения были выявлены статистически значимые различия между группами по времени операции и объему костного дефекта (Таблица 5.1). В основной группе медиана времени операции составила 60 минут (МКИ 50,0–70,0), что было значимо меньше, чем в группе сравнения – 80 минут (МКИ 65,0–120,0; $p = 0,002$). При этом объем костного дефекта, замещенного в ходе операции, в основной группе был статистически значимо больше – 40 мл (МКИ 15,0–55,0) против 15 мл (МКИ 10,0–30,0) в группе сравнения ($p = 0,002$). По объему интраоперационной кровопотери и срокам дренирования раны группы статистически значимо не различались ($p > 0,05$).

Таблица 5.1 – Интра- и послеоперационные характеристики второго этапа лечения, Ме (Q1-Q3)

Показатель	Основная группа (n=25)	Группа сравнения (n=25)	Значение p
Время операции, мин	60,0 (50,0-70,0)	80,0 (65,0-120,0)	0,002
Кровопотеря, мл	50,0 (40,0-100,0)	150,0 (50,0-250,0)	0,104
Объем костного дефекта, мл	40,0 (15,0-55,0)	15,0 (10,0-30,0)	0,002
Сроки дренирования, сутки ¹	1,0 (0,0-4,0)	0,0 (0,0-3,0)	0,240

Примечание: 1 – это медиана по всей группе, включая пациентов без дренажа (0 суток) или с ранним его удалением (определялось на основе интраоперационной картины). Определение концентрации ванкомицина на 1–5-е сутки выполнялось только у тех пациентов, у кого дренаж сохранялся соответствующее число суток (ОГ n = 8, ГС n = 5)

В послеоперационном периоде установлены значимые различия в лабораторных показателях между группами (таблица 5.2). В основной группе был значимо выше уровень СРБ ($p < 0,001$) и значимо ниже уровень гемоглобина ($p = 0,020$) и количество эритроцитов ($p = 0,002$) перед впиской. При этом

количество лейкоцитов было сопоставимо в обеих группах и находилось в пределах референсных значений. Проведенный корреляционный анализ показал наличие статистически значимой прямой умеренной связи послеоперационного уровня С-реактивного белка с объемом костного дефекта (Спирмен: $r = 0,346$; $p = 0,014$). Также была выявлена прямая корреляционная связь умеренной силы между объемом интраоперационной кровопотери и временем операции (Спирмен: $r = 0,508$; $p < 0,001$). Иных статистически значимых взаимосвязей в общей выборке обнаружено не было ($p > 0,05$).

Таблица 5.2 – Динамика лабораторных показателей периоперационного периода второго этапа лечения

Период	Основная группа (n=25)	Группа сравнения (n=25)	P- значение
	Me (25-75% МКИ)	Me (25-75% МКИ)	
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$			
До операции	7,00 (5,88-8,27)	6,00 (4,90-7,00)	0,093
После операции	6,60 (6,00-7,85)	6,30 (5,10-7,40)	0,263
СРБ, мг/л			
До операции	2,69 (1,48-4,97)	1,00 (0,49-2,99)	0,028
После операции	25,12 (13,35-41,05)	3,22 (1,94-6,72)	<0,001
Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$			
До операции	4,81 (4,62-5,00)	5,07 (4,87-5,11)	0,067
После операции	3,96 (3,73-4,44)	4,55 (4,17-4,92)	0,002
Гемоглобин, г/л			
До операции	137,50 (132,75-151,00)	142,00 (135,00-152,00)	0,548
После операции	116,50 (100,25-129,75)	124,00 (121,00-138,00)	0,020

Внутригрупповой анализ показал наличие в основной группе прямой монотонной корреляции умеренной силы между объемом кровопотери и временем операции (Спирмен: $r = 0,427$; $p = 0,033$). Примечательно, что в данной группе не было установлено статистически значимых связей между объемом замещенного костного дефекта и изученными лабораторными или интраоперационными показателями, включая кровопотерю ($p > 0,05$).

В группе сравнения, напротив, было выявлено несколько сильных и статистически значимых корреляционных связей. Помимо сильной прямой линейной корреляции между объемом кровопотери и временем операции (Пирсон: $r = 0,732$; $p < 0,001$), установлены статистически значимые обратные линейные корреляции умеренной силы между объемом кровопотери и послеоперационными уровнями эритроцитов (Пирсон: $r = -0,466$; $p = 0,019$) и гемоглобина (Пирсон: $r = -0,578$; $p = 0,002$). Связей между объемом костного дефекта и другими переменными в данной группе, как и в основной, выявлено не было ($p > 0,05$).

Таким образом, проведенный анализ показал, что в обеих группах увеличение времени операции было сопряжено с ростом объема кровопотери (рисунок 5.1.), однако в группе сравнения эта связь была выражена значительно сильнее. Только в группе сравнения объем кровопотери был напрямую ассоциирован со степенью снижения послеоперационных уровней эритроцитов и гемоглобина. В то же время, выявленная в общей выборке взаимосвязь между объемом костного дефекта и уровнем СРБ подтверждает закономерность развития асептической воспалительной реакции, пропорциональной объему проведенного вмешательства.

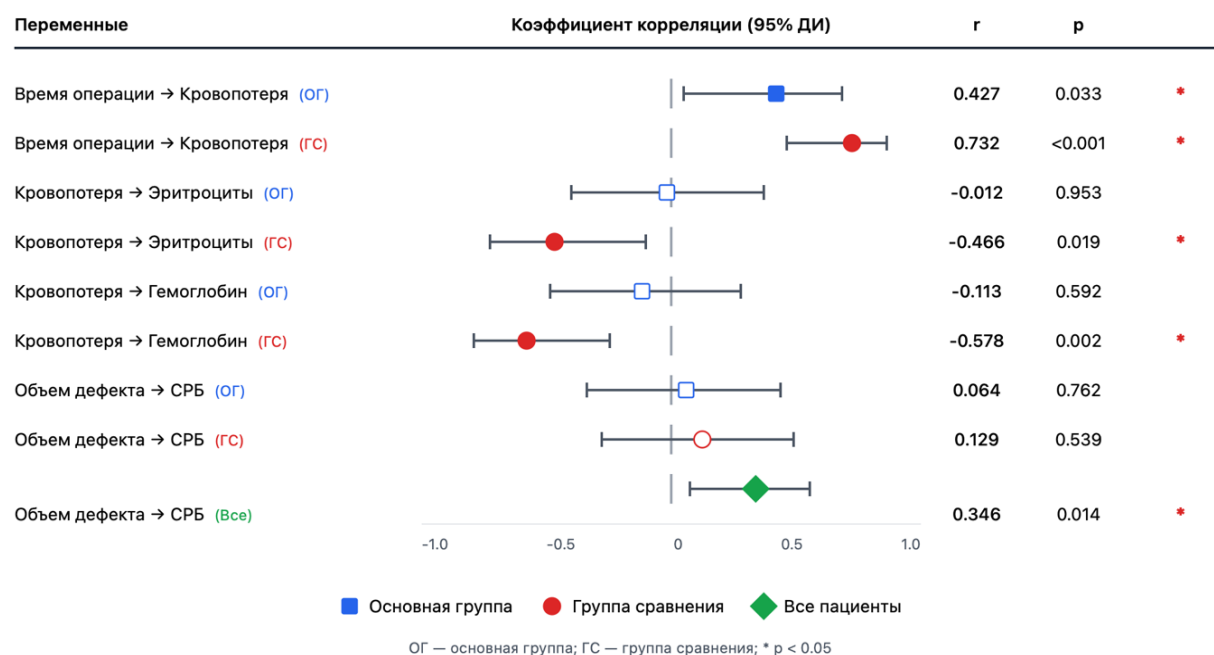


Рисунок 5.1 – Forest plot коэффициентов корреляции с 95% доверительными интервалами по показателям время операции, объем дефекта, кровопотеря и лабораторным данным

Детальный анализ клинических случаев с экстремально высоким уровнем СРБ) (>100 мг/л) в основной группе показал, что развитие гиперреактивного воспалительного ответа было ассоциировано с большим объемом замещенного костного дефекта (>55 мл) и подтверждено результатами корреляционного анализа. У данных пациентов с объемом костных дефектов 60 мл, 70 мл и 55 мл уровень СРБ перед выпиской составил соответственно 106,75 мг/л, 175,11 мг/л и 142,82 мг/л. При этом, несмотря на высокие значения СРБ, во всех случаях отсутствовали локальные признаки воспаления, а результаты интраоперационного микробиологического исследования были отрицательными. При последующем катamnестическом наблюдении рецидива инфекционного процесса у данных пациентов диагностировано не было.

5.2 Концентрация ванкомицина в дренажном отделяемом

Выявлены статистически значимые различия между группами в первые сутки после операции (рисунок 5.2.). В основной группе медиана концентрации ванкомицина составила 3119,5 мкг/мл (МКИ 868,75–6990), что было более чем в 10 раз выше, чем в группе сравнения, где этот показатель составил 280 мкг/мл (МКИ 265–430; $p = 0,030$).

На вторые сутки концентрация антибиотика в обеих группах снизилась, и различие между основной группой (ОГ) (медиана 447 мкг/мл) и группой сравнения (медиана 185 мкг/мл) уже не достигало статистической значимости ($p = 0,106$).

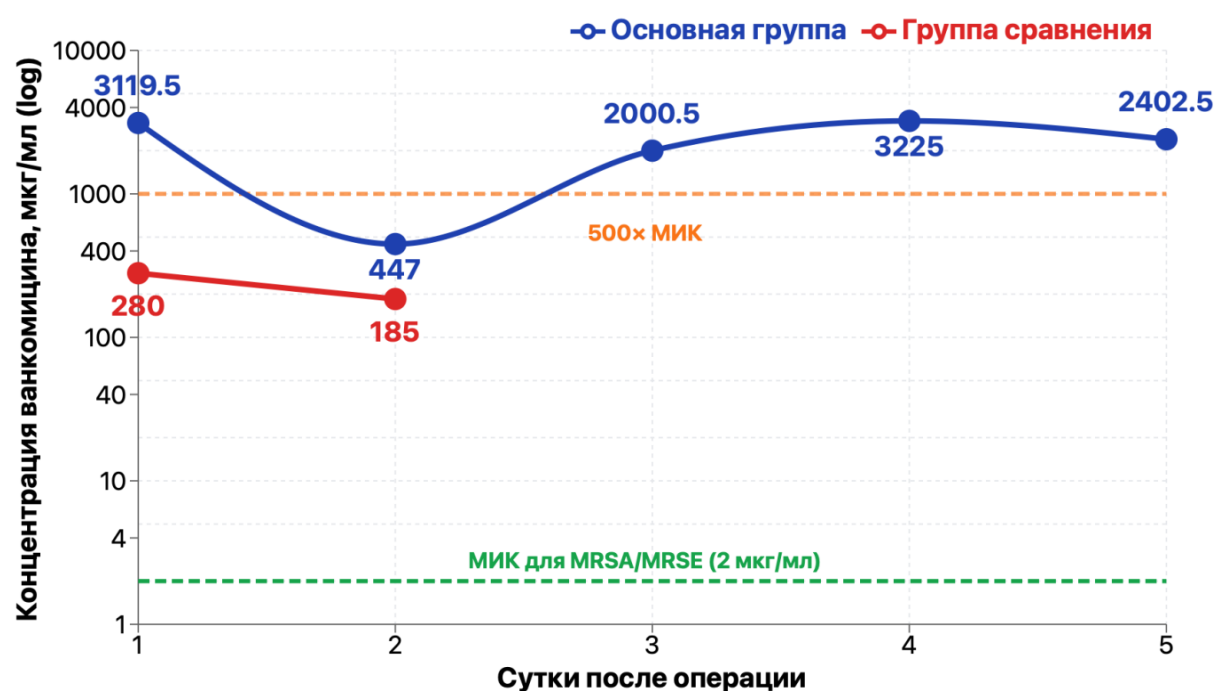


Рисунок 5.2 – Динамика концентрации ванкомицина в дренажном отделяемом

Важно отметить, что у пациентов основной группы дренирование раны продолжалось до пяти суток, и на протяжении всего этого периода

регистрировались высокие терапевтические концентрации ванкомицина. Таким образом, было установлено, что в течение всего времени дренирования у пациентов основной группы определялся уровень антибиотика, в тысячи раз превышающий минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) ванкомицина в отношении стафилококков.

5.3 Результаты МБИ и клинические исходы

При интраоперационном бактериологическом исследовании тканевых биоптатов, взятых при удалении спейсера, в основной группе в 7 (28,0%) случаях были выделены 13 изолятов диагностически значимых возбудителей. В группе сравнения в 14 (56,0%) случаях были выделены 19 штаммов микроорганизмов ($p = 0,085$). Структура выделенных изолятов между исследуемыми группами статистически значимо не различалась (Таблица 5.3). Однако *S. aureus* (MSSA, $n=3$) были выделены только в основной группе ($p = 0,235$), в то время как в группе сравнения лидирующими были КНС ($n=10$), преимущественно MRSE ($n=7$). Частота выделения грамотрицательных бактерий и анаэробов в группах сравнения была сопоставима.

В результате проведенного лечения инфекцию удалось купировать в 96,0% случаев в основной группе и 92,0% - в группе сравнения ($p = 1,000$). Рецидивы были диагностированы у 1 (4,0%) пациента основной группы через 8,5 месяцев после операции (таблица 5.4) и у 2 (8,0%) пациентов группы сравнения через 7,3 и 8,0 мес. (рисунок 5.3).

Таблица 5.3 – Спектр микроорганизмов, выделенных при втором этапе хирургического лечения, n (%)

Категория микроорганизмов	Основная группа	Группа сравнения	p ¹
<i>S. aureus</i>	3 (12,0%)	0 (0%)	0,235
Коагулазонегативные стафилококки (кнс)	3 (12,0%)	10 (40,0%)	0,024
Гр(-) бактерии	2 (8,0%)	2 (8,0%)	1,000
Анаэробные бактерии	4 (16,0%)	6 (24,0%)	0,480
Другие	1 (4,0%)	1 (4,0%)	1,000
Итого (выделенных штаммов)	13	19	-

Примечания:

- ¹ Точный критерий Фишера
- КНС включают: *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*
- Гр(-) бактерии: *P. aeruginosa*, *B. ceracia complex*, *O. anthropi*
- Анаэробные бактерии: преимущественно *C. acnes*

Во всех случаях рецидивы развились у пациентов с положительными результатами интраоперационных посевов на втором этапе лечения. При этом, частота развития рецидива в подгруппах пациентов с верифицированной на 2-м этапе лечения латентной инфекцией составила 14,3% в общей исследуемой когорте. Среди пациентов с отсутствием бактериального роста из тканевых биоптатов рецидива заболевания в течение периода наблюдения отмечено не было. Это подчеркивает высокую прогностическую ценность интраоперационного микробиологического исследования для стратификации рисков неблагоприятного исхода лечения.

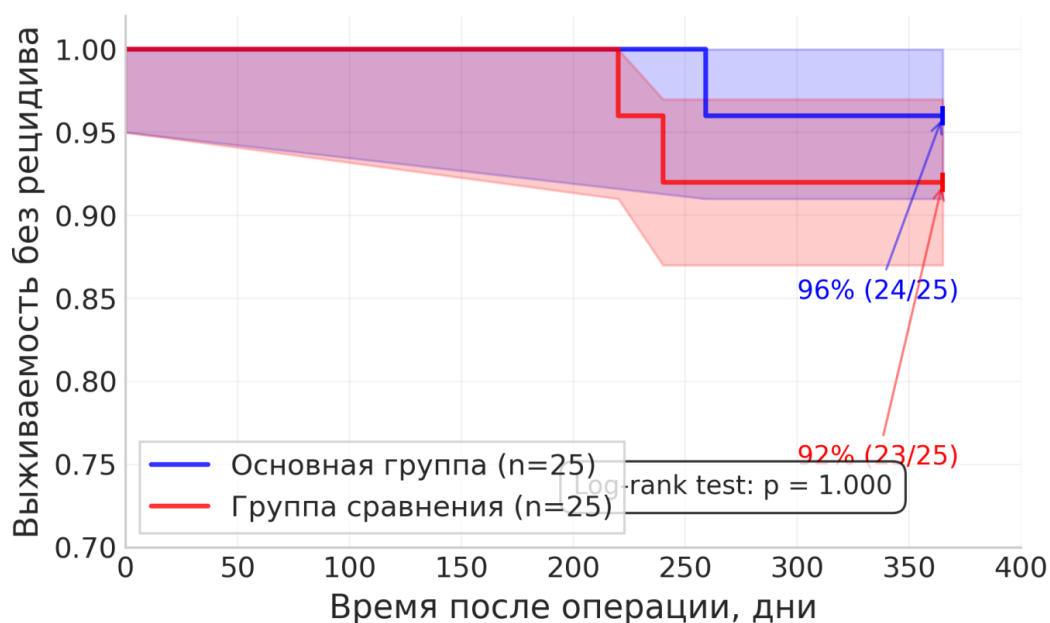


Рисунок 5.3 – Кривая выживаемости без рецидива инфекции

Таблица 5.4 – Анализ рецидивов хронического остеомиелита в исследуемых группах

Рецидивы	ОГ, n/N (%)	ГС, n/N (%)	Значение P ¹
Всего, n (%)	1/25 (4,0)	2/25 (8,0)	1,000
При наличии роста из биоптатов	1/7 (14,3)	2/14 (14,3)	1,000
При отсутствии роста из биоптатов	0/18 (0,0)	0/11 (0,0)	—
При выделении микробных Ассоциаций	1/1 (100,0)	1/2 (50,0)	1,000

Примечание: ¹ Точный критерий Фишера

n/N – количество пациентов с рецидивом / общее количество пациентов в соответствующей группе

Прочерк (—) указывает на невозможность расчета статистической значимости при отсутствии событий

Было отмечено, что рецидивы инфекции были ассоциированы с полимикробным характером инфекционного процесса. Так, у пациента основной группы с рецидивом была выявлена сложная ассоциация четырех микроорганизмов. В группе сравнения в одном из двух случаев рецидивов также была выявлена микробная ассоциация. Низкая частота рецидивов (6% общ.) у пациентов, включенных в исследование, свидетельствует о высокой эффективности

второго этапа хирургического лечения с применением костнопластических материалов с антибактериальными свойствами.

5.4 Результаты МСКТ исследования при контрольном осмотре

Качественный анализ МСКТ-изображений продемонстрировал у всех пациентов полную структурную интеграцию имплантированного материала с формированием единой трабекулярной архитектоники. Визуальная граница между трансплантатом и нативной костью, как правило, не дифференцировалась, что интерпретируется как завершённый цикл ремоделирования. Во всех наблюдениях отсутствовали компьютерно-томографические признаки рецидива инфекционного процесса: не выявлялись полости распада, секвестры, перифокальный склероз или свищевые ходы. Анатомическая форма и ось оперированного сегмента сохранены, что косвенно подтверждает достаточную механическую состоятельность сформированного костного блока.

Количественный денситометрический анализ подтвердил выявленные визуальные тенденции. Средние значения рентгеновской плотности ($M \pm SD$) составили: для нативной кости – $485,51 \pm 115,58$ HU, для трансплантата – $569,38 \pm 98,16$ HU, для зоны интерфейса – $677,19 \pm 44,79$ HU. Таким образом, минимальные значения плотности регистрировались в нативной губчатой кости, более высокие – в ремоделированном трансплантате, а максимальные – в зоне контакта «трансплантат–кость». Обращает на себя внимание и меньшая вариабельность показателей в зоне интерфейса, что отражает стабильность и однородность сформированного костного мостика. На комбинированной визуализации распределений разница медианных значений и межквартильных интервалов между тремя ROI прослеживалась отчётливо (рисунок 5.4).

Проведенный статистический анализ свидетельствует о последовательном повышении минерализационной зрелости от нативной губчатой кости к ремоделированному трансплантату и далее – к интерфейсной зоне, где

формируется наиболее плотная и, вероятно, наиболее нагруженная часть регенерата.

С клинической точки зрения выявленный профиль плотности отражает успешную биологическую интеграцию материала и завершение процессов консолидации. Превышение средней плотности ремоделированного трансплантата над показателями прилежащей нативной губчатой кости интерпретируется как признак его зрелой перестройки с формированием более минерализованной структуры, местами с тенденцией к кортикализации. Наиболее высокая и наименее вариабельная плотность в зоне интерфейса указывает на образование прочного костного мостика в области контакта «трансплантат–кость», что представляет собой рентгенологический критерий завершённой интеграции и долговременной стабильности соединения.

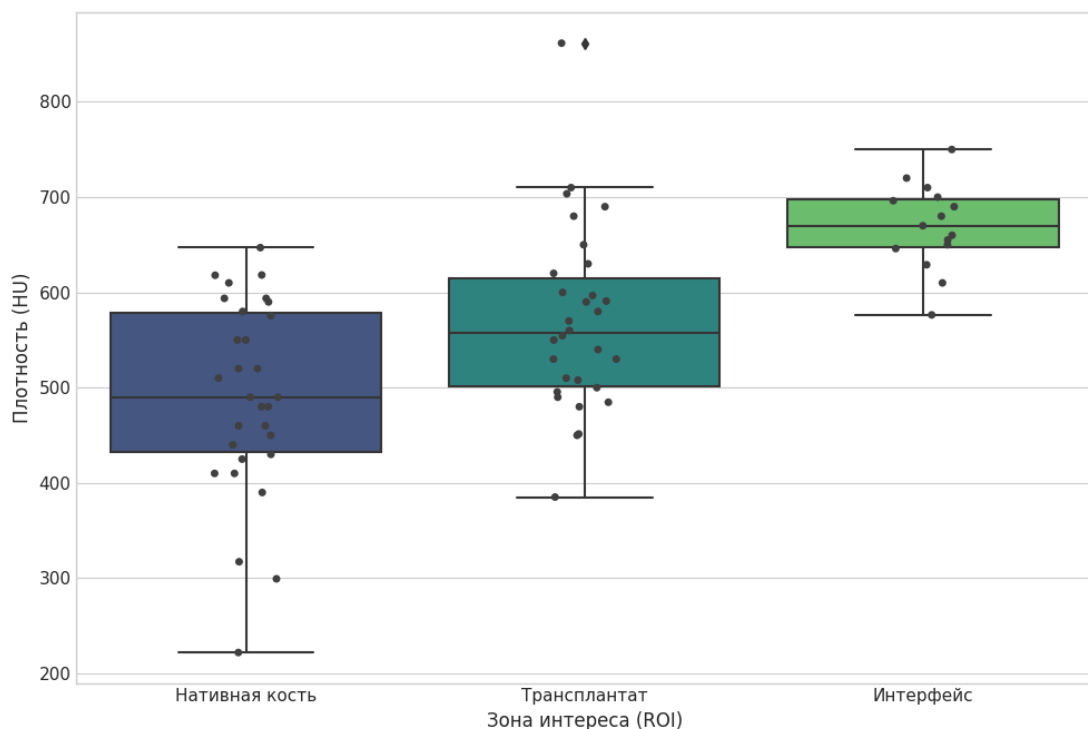


Рисунок 5.4 – Box-plot плотности в единицах HU в различных зонах при проведении контрольного МСКТ.

Значения HU могут зависеть от параметров сканирования и калибровки, поэтому межпациентская сопоставимость требует унифицированных протоколов и, по возможности, применения калибровочных фантомов. Тем не менее даже при консервативной интерпретации результаты демонстрируют устойчивый и клинически значимый градиент плотности, согласующийся с качественными признаками перестройки костной ткани.

Клинический пример

Представлено клиническое наблюдение пациента с хроническим посттравматическим остеомиелитом диафиза левой большеберцовой кости после накостного остеосинтеза. Лечение осуществлялось в два этапа.

Пациент М. поступил с жалобами на множественные свищи с гнойным отделяемым в области средней трети левой голени, хромоту и дискомфорт при нагрузке. Из анамнеза: в октябре 2020 года – закрытый перелом обеих костей левой голени; выполнен накостный остеосинтез пластиной и винтами. Послеоперационно развилась инфекция области хирургического вмешательства, потребовавшая в феврале 2021 года удаления металлоконструкции, наложения аппарата внешней фиксации (АВФ) и проточно-промывного дренирования; в мае 2021 консолидация отломков достигнута, АВФ демонтирован, в июне 2021 рецидив инфекции – повторная санация. В п/о периоде - рецидив хронического остеомиелита диафиза большеберцовой кости с формированием трансоссальных свищевых ходов.

При поступлении в отделение гнойной хирургии №4 НМИЦ ТО им. Р. Р. Вредена (октябрь 2021) пациент ходит с хромотой; слева отек и гиперемия, гипертрофический рубец до 25 см по переднелатеральной поверхности, три функционирующих свища с гнойным отделяемым по передней поверхности средней трети; дистальное кровоснабжение и иннервация сохранены. Лабораторно: С-реактивный белок 10 мг/л, количество лейкоцитов $7 \times 10^9/\text{л}$ и СОЭ 13 мм/ч. КТ от 13.10.2021: диффузная остеомиелитическая деструкция проксимальной и средней трети диафиза большеберцовой кости с частичной облитерацией

костномозгового канала; рентгенография подтверждает консолидацию переломов и признаки хронического остеомиелита (рисунки 5.5 и 5.6). 14.10.2021 выполнена радикальная хирургическая обработка очага с широким иссечением свищей и некротических тканей, заполнение дефекта цементным спейсером в виде «бус» (PMMA DePuy CMW3 с гентамицином) с добавлением 4 г ванкомицина (рисунок 5.7). МБИ тканевых биоптатов от 14.10.2021: выделены *Enterococcus faecalis* и *Staphylococcus aureus* (MSSA). Антибактериальная терапия: ванкомицин 1 г 2 раза в сутки в/в 7 дней и цефоперазон/сульбактам 4 г 2 раза в сутки в/в 7 дней; при выписке рекомендованы амоксициллин/клавуланат 1 г 2 раза в сутки и ципрофлоксацин 750 мг 2 раза в сутки внутрь в течение 2 месяцев.



Рисунок 5.5 – Рентгенография (+ фистулография) левой голени до 1-го этапа лечения (13.10.2021; прямая (А) и боковая (В) проекции): Консолидированные переломы обеих костей голени. Признаки хронического остеомиелита диафиза большеберцовой кости: неоднородность трабекулярного рисунка, участки остеолиза и перифокального склероза; сохраняется осевая ориентировка конечности



Рисунок 5.6 – КТ левой голени до 1-го этапа (13.10.2021) сагиттальная (А), корональная реконструкция (В):

Диффузная остеомиелитическая деструкция проксимальной и средней трети диафиза большеберцовой кости: полостные внутрикостные изменения с перифокальным склерозом, множественные кортикальные дефекты, частичная облитерация костномозгового канала, секвестры, признаки хронизации процесса

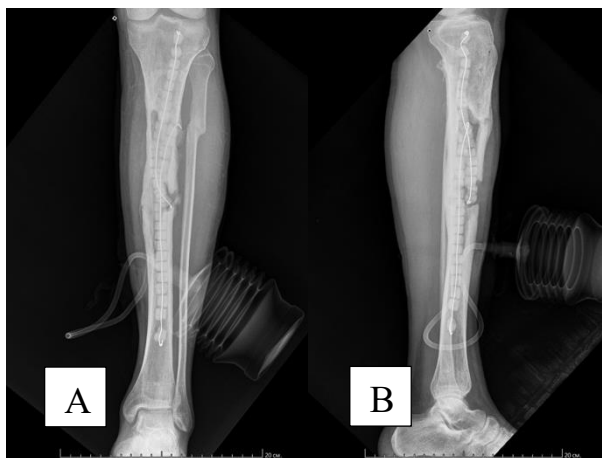


Рисунок 5.7 – Рентгенограммы левой голени после 1-го этапа хирургического лечения: прямая (А) и боковая (В) проекции: Интрамедуллярно визуализируется антибиотик-цементный спейсер в виде «буса» (РММА с гентамицином и добавлением ванкомицина), соответствующий зоне полостного дефекта средней трети большеберцовой кости. Признаков вторичного смещения нет

На втором этапе лечения (госпитализация в феврале 2022) отмечалось клиническое улучшение: рубец 25 см без признаков воспаления, умеренный отёк, ходьба с помощью костылей. Лабораторно без особенностей, CRP 0,88 мг/л.

09.02.2022 выполнено оперативное лечение: удаление «бус» спейсера (рисунок 5.8 А, В), иссечение рубцово-грануляционных тканей и пластика полостного дефекта (около 50 мл) (рисунок 5.8 С) оригинальным ОЗ материалом на основе аллокости, импрегнированной ванкомицином (рисунок 5.7. D, E, F); дренирование. Рг контроль в п/о периоде (рисунок 5.9).

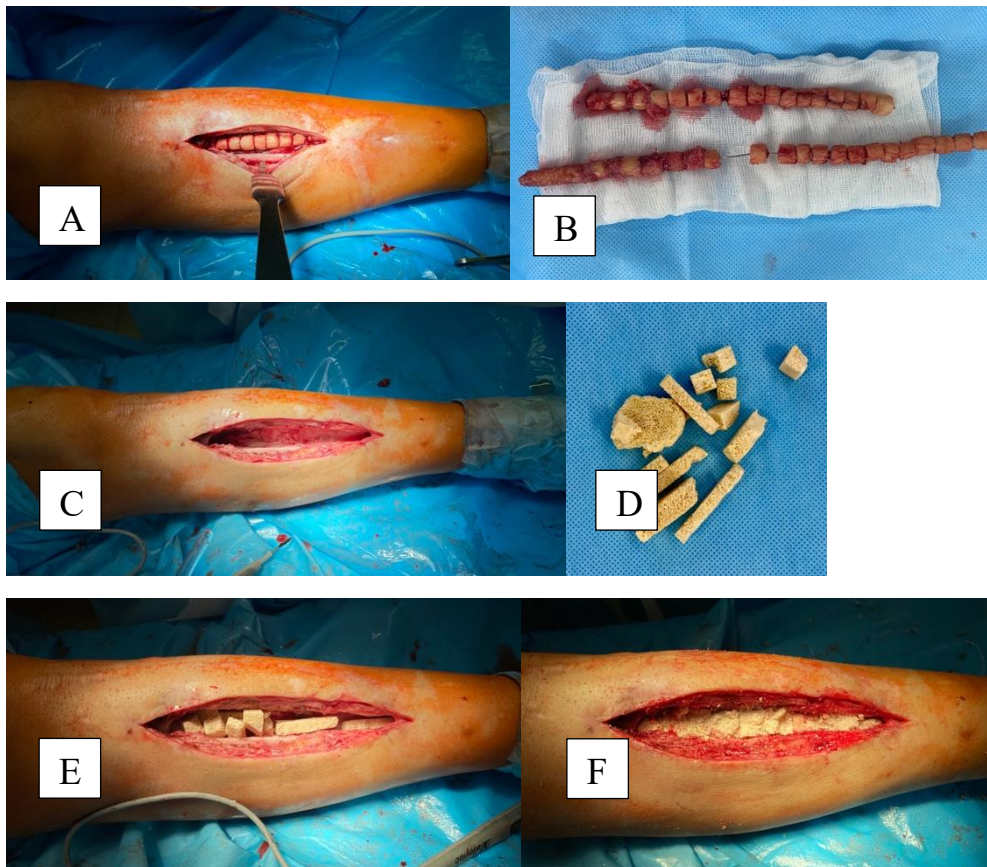


Рисунок 5.8 – Ход 2 этапа оперативного лечения:

А – доступ к области дефекта б/берцовой кости в ср/3; В – удаление спейсера в виде бус; С – сформированный дефект б/берцовой кости 50мл; D – индивидуально подготовленные блоки оригинального ОЗ материала, импрегнированного ванкомицином; E, F – замещение дефекта оригинальным ОЗ материалом



Рисунок 5.9 – Рентгенограммы левой голени после 2-го этапа (11.02.2022): прямая (А) и боковая (В). Спейсер удалён; полостной дефект заполнен аллокостью, импрегнированной ванкомицином, (плотностная реституция в пределах прежнего дефекта). Ось конечности сохранена

Микробиологически (09.02.2022) - рост MSSA с широкой чувствительностью (включая оксациллин, рифампицин, линезолид, клиндамицин, тетрациклин, гентамицин) и промежуточной чувствительностью к фторхинолонам; также выделен *Cutibacterium acnes*.

В послеоперационном периоде. АБ терапия была идентична терапии после выполнения 1 этапа хирургического лечения: ванкомицин 1 г 2 раза в сутки в/в 7 дней и цефоперазон/сульбактам 4 г 2 раза в сутки в/в 7 дней; при выписке рекомендованы амоксициллин/клавуланат 1 г 2 раза в сутки и ципрофлоксацин 750 мг 2 раза в сутки внутрь в течение 2 месяцев.

При контрольном визите пациента на сроках 1, 2, 3 года от оперативного лечения клинически и лабораторно данных за рецидив инфекционного процесса не получено.

При контрольной (МСКТ) левой голени, выполненной через 3 года после второго этапа хирургического лечения, визуализируется перестраивающийся ОЗ материал в зоне бывшего костного дефекта средней трети диафиза большеберцовой кости (рисунок 5.10).



Рисунок 5.10 – МСКТ левой голени через 3 года после операции (сагиттальная (А) и корональная (В) реконструкции):

Демонстрируется остеоинтеграция ОЗ материала с формированием единой трабекулярной структуры, неотличимой от нативной кости. Признаки рецидива инфекционного процесса, полостных или литических изменений отсутствуют

Зона, заполненная оригинальным остеопластическим материалом, демонстрирует признаки завершённого ремоделирования и структурной перестройки. Трабекулярная структура костной ткани в области бывшего дефекта практически не отличается от структуры прилежащей нативной кости. Границы между имплантированным материалом и костью пациента четко не дифференцируются, что свидетельствует о остеоинтеграции.

Признаки рецидива остеомиелитического процесса, такие как формирование полостей, секвестров, выраженный перифокальный склероз или свищевые ходы, отсутствуют. Сохраняется правильная анатомическая форма и ось большеберцовой кости.

Количественный анализ радиологической плотности (КТ-денситометрия): средняя плотность в области трансплантата (563,2 HU) сопоставима с плотностью нативной губчатой кости (491,0 HU). Формирование зоны повышенной плотности на стыке «трансплантат-кость» (640,5 HU) является объективным признаком создания прочного костного блока и завершения интеграционных процессов.

Обсуждение клинического случая

Данный случай иллюстрирует классическую эволюцию посттравматического остеомиелита после накостного остеосинтеза: формирование хронического очага с секвестрами и свищами, диффузное вовлечение кортикального и медуллярного компонентов и необходимость многократных вмешательств. Второй – реконструктивный этап хирургического лечения был направлен на устранение инородного материала, восстановление анатомии и объёма кости с применением антибиотик-импрегнированного ОЗ материала.

Микробиологически отмечена смена возбудителей: исходно выделена микробная ассоциация (*E. faecalis* и MSSA), ко второму этапу – MSSA и *S. acnes*.

Динамика CRP и фибриногена соответствовала ожидаемой послеоперационной реакции с тенденцией к снижению к концу срока госпитализации, без стойкого лейкоцитоза. Наличие лёгкой микроцитарной анемии и повышенного RDW указывает на железодефицитный компонент/анемию

хронического воспаления – типичный симптом при длительных гнойно-деструктивных процессах в костях.

Представленный подход демонстрирует важность радикальности санации и адекватной локальной антибиотикотерапии, даже при выполнении второго, «чистого», этапа лечения без локальных и системных признаков воспалительного процесса.

5.5 Резюме.

Проведенный сравнительный анализ показал высокую клиническую эффективность применения антибиотикосодержащих биodeградируемых остеозамещающих материалов при выполнении реконструктивного этапа двухэтапного лечения хронического остеомиелита, с низким количеством рецидивов инфекции в обеих группах – 4,0% в основной и 8,0% в группе сравнения ($p = 1,000$).

Применение оригинального остеопластического материала на основе ГБК в сравнении с биокомпозитным материалом на основе 3-КФ-ГА было ассоциировано с рядом интраоперационных преимуществ, таких как статистически значимое сокращение времени операции и возможность одномоментного замещения костных дефектов большего объема с созданием значительно более высоких локальных концентраций ванкомицина в ране, которые к концу периода дренирования (5 сут) вышли на плато с медианными концентрациями 2402,5–3225,0 мкг/мл (МКИ 2187–3225 мкг/мл). Было также установлено, что более выраженная системная воспалительная реакция в виде повышения уровня СРБ в основной группе носила асептический характер и была напрямую связана с объемом костного дефекта, что подтверждено результатами корреляционного анализа.

Ключевым прогностическим фактором неблагоприятного исхода была персистенция инфекции на момент второго этапа лечения, так как все случаи

рецидива были зафиксированы исключительно у пациентов с положительными результатами МБИ тканевых биоптатов. Частота рецидива в подгруппе пациентов с полученным бактериальным ростом составила 14,3% в обеих группах. Также было установлено, что рецидивы были ассоциированы с полимикробным характером инфекции.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанный оригинальный остеопластический материал, импрегнированный ванкомицином, является эффективным и безопасным средством для реконструктивного этапа лечения хронического остеомиелита. Он не уступает по клинической эффективности коммерческому биокompозитному материалу, смешанному с антибиотиком, при этом обладая преимуществами в виде удобства интраоперационного применения и обеспечения более высоких локальных концентраций антибиотика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предпосылками для планирования настоящего исследования явились высокая частота рецидивов хронического остеомиелита (10-30%), ограниченная эффективность системной антибактериальной терапии из-за формирования биопленок и нарушения локального кровоснабжения, а также существенные недостатки доступных систем локальной доставки антибиотиков - небиodeградируемость ПММА, неоптимальная фармакокинетика солей кальция и отсутствие остеоиндуктивных свойств у большинства синтетических материалов [21, 68, 93, 95, 134]. Особую актуальность приобретает отсутствие в Российской Федерации зарегистрированных остеопластических материалов с пролонгированной элюцией антибиотиков, аналогичных применяемым в странах ЕС (OSTEOmycin®, AlloMatrix®). Все это позволило сформулировать цель работы – 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, для достижения которой были поставлены и решены пять задач.

В ходе решения первой задачи был разработан оригинальный способ получения лиофилизированного биodeградируемого костнопластического материала на основе аллогенных головок бедренных костей. Предложенный комплексный пятифазный протокол включал циклическую физико-химическую очистку с последовательным применением растворов гидрокарбоната натрия, перекиси водорода и этанола в сочетании с ультразвуковой кавитацией, орбитальным встряхиванием и термической обработкой. Разработанный подход соответствует принципам, изложенным в современной литературе, где указывается, что традиционно костные аллотрансплантаты сохраняются путем замораживания или лиофильной сушки, причем каждый из этих методов имеет определенные

недостатки: замороженные трансплантаты требуют специальных условий транспортировки и хранения, а лиофилизация требует специального оборудования и может повлиять на биомеханическую целостность [62, 63, 68, 131]. Морфологический анализ методом СЭМ подтвердил полное удаление клеточных элементов и жирового костного мозга при сохранении нативной трехмерной архитектуры губчатой кости. Элементный состав материала по данным ЭДС соответствовал природному гидроксиапатиту: кислород 53,87%, кальций 30,11%, фосфор 14,97%. Биомеханические испытания показали, что разработанная технология не только сохраняет, но и улучшает прочностные характеристики: предел прочности увеличился с $8,8 \pm 1,9$ МПа для нативной кости до $20,3 \pm 3,6$ МПа после химической очистки и $16,0 \pm 4,2$ МПа после лиофилизации ($p = 0,116$), при этом относительная деформация после лиофилизации восстанавливалась до уровня нативной кости ($32,2 \pm 7,7\%$ против $35,4 \pm 6,3\%$).

Современные исследования подтверждают, что лиофилизированные костные аллотрансплантаты и деминерализованные лиофилизированные костные аллотрансплантаты продолжают оставаться наиболее востребованными аллотрансплантатами в клинической практике благодаря их остеокондуктивным и остеоиндуктивным свойствам. Известно, что технология лиофильной сушки удаляет более 95% воды из кости, что и позволяет хранить ткани при комнатной температуре и снижает антигенность [62, 63]. Биосовместимость полученного в ходе исследования материала подтверждена в экспериментах с ММСК: жизнеспособность клеток по МТТ-тесту составила $0,497 \pm 0,207$, что сопоставимо с контролем, а экспрессия остеогенных маркеров BMP2 и RUNX2 увеличилась после 14 дней культивирования в остеогенной среде.

В ходе решения второй задачи на модели асептического дефекта большеберцовой кости у 18 кроликов проведена сравнительная оценка остеointеграции разработанного материала и свежемороженой аллокости. К 14-м суткам в основной группе на поверхности имплантата формировались полосы остеоида, что свидетельствовало об активной остеокондукции, в то время как в контрольной группе костные фрагменты инкапсулировались плотной

фиброзной тканью без признаков остеогенеза. К 45-м суткам в основной группе наблюдалось созревание молодой костной ткани в пластинчатую, при этом полное восстановление кортикальной пластинки достигалось не во всех случаях. В контрольной группе костные фрагменты оставались инкапсулированными, что препятствовало их интеграции. К 90-м суткам в основной группе отмечалось практически полное ремоделирование дефекта с формированием зрелой пластинчатой кости и костномозгового канала, заполненного кроветворным костным мозгом, встречались лишь единичные частично резорбированные фрагменты имплантата. В контрольной группе целостность кортикальной пластинки к концу срока наблюдения не восстановилась.

Для решения третьей задачи было проведено исследование влияния параметров импрегнации на кинетику элюции ванкомицина. Сравнительный анализ различных методик показал, что наиболее значимым фактором ($F=19,9916$, $p < 0,0001$) является давление, за ним следуют тип растворителя ($F=7,7485$, $p = 0,0006$) и время импрегнации ($F=6,8084$, $p = 0,0014$). Импрегнация в водном растворе при атмосферном давлении обеспечивала антимикробную активность только 4-6 дней с площадью под кривой элюции (AUC) 13108-23497. Применение вакуума (7-10 hPa) увеличивало длительность элюции до 8-10 дней. Максимальная эффективность достигнута при использовании 50% этанола с 5% поливинилпирролидоном в условиях вакуума: длительность антимикробной активности против MRSA составила 14 дней, $AUC=301364,7$, что в 23 раза превышало базовую методику.

Концентрация ванкомицина в инкубационной среде в первые сутки достигала 82755 ± 2069 мкг/мл с последующим экспоненциальным снижением ($R^2=0,936$). Установлена сильная корреляция между концентрацией антибиотика и диаметром зоны подавления роста ($r=0,908$, $p < 0,001$). Важность высоких локальных концентраций подчеркивается в современной литературе, где указывается, что локальная антибиотикотерапия эффективна для эрадикации зрелых бактериальных биопленок при достижении концентраций ванкомицина минимум 200-500 мкг/мл в течение не менее 72 часов, при этом применение

антибиотик-содержащего костного трансплантата обеспечивает значительно большую локальную концентрацию препарата, чем использование импрегнированного антибиотиками костного цемента на основе ПММА [31]. Стабильность антимикробных свойств разработанного в ходе исследования материала сохранялась в течение 18 месяцев хранения, с последующим снижением активности к 24 месяцам.

Для решения четвертой задачи на модели хронического остеомиелита у 18 кроликов изучена эффективность разработанного материала, импрегнированного ванкомицином, в сравнении с коммерческим материалом на основе β -ТКФ/ГА, смешанного с аналогичным антибиотиком *ex tempore*. Моделирование остеомиелита проводили с использованием *S. aureus*, который является наиболее частым патогеном, приводящим к некрозу и разрушению кости [167]. Микробиологическое исследование на всех сроках наблюдения подтвердило эрадикацию *S. aureus* в обеих группах. Морфометрический анализ выявил закономерную динамику репаративных процессов в основной группе: относительная площадь воспаления снизилась с 78,19% на 14-е сутки до 32,65% на 90-е сутки (линейная регрессия: $y=87,99-0,605x$, $R^2=0,993$). Остеобластическая активность прогрессивно нарастала с 3,99% до 11,37% ($y=3,02+0,096x$, $R^2=0,978$), в то время как остеокластическая активность имела нелинейную динамику с пиком на 45-е сутки (4,29%). Доля некротизированной кости снизилась с 57,31% до 34,59% ($y=62,43-0,303x$, $R^2=0,988$). Установлена сильная обратная корреляция между остеобластической активностью и площадью воспаления ($r=-0,275$, $p=0,009$), а также долей некротизированной кости ($r=-0,514$, $p<0,001$). Статистически значимых различий в объеме новообразованной костной ткани между группами сравнения на 45-е и 90-е сутки не выявлено ($p>0,05$), что свидетельствует о сопоставимой динамике перестройки материалов.

В ходе решения пятой задачи проведен сравнительный анализ клинической эффективности у 50 пациентов с хроническим остеомиелитом при выполнении второго этапа хирургического лечения. В основной группе ($n=25$) применялся разработанный материал, в группе сравнения ($n=25$) – коммерчески доступный ОЗ

материал с ванкомицином. Группы были сопоставимы по демографическим и клиническим характеристикам. Несмотря на значимо больший объем имплантируемого материала в основной группе (40 мл против 15 мл; $p = 0,002$), продолжительность оперативного вмешательства была статистически значимо меньше и составила 60 минут по сравнению с 80 минутами в группе сравнения ($p = 0,002$).

Концентрация ванкомицина в дренажном отделяемом в первые сутки в основной группе составила 3119,5 мкг/мл, что в 10 раз превышало показатель группы сравнения - 280 мкг/мл ($p = 0,030$). Полученные результаты соответствуют современным данным о том, что все носители первоначально выделяют большое количество ванкомицина с последующим его постоянным снижением. При этом начальный выход ванкомицина, может быть максимальным для аллотрансплантатов, а последующая динамика элюции различается в зависимости от костнопластического материала – носителя антибиотика [61, 137]. Высокие терапевтические концентрации сохранялись в течение всего периода дренирования (до 5 суток). Уровень СРБ после операции был выше в основной группе (25,12 мг/л против 3,22 мг/л, $p < 0,001$), что коррелировало с большим объемом дефекта ($r=0,346$, $p = 0,014$) и носило асептический характер. При интраоперационном микробиологическом исследовании рост микроорганизмов выявлен у 28% пациентов основной группы и 56% группы сравнения ($p = 0,085$). Частота рецидивов составила 4,0% в основной группе и 8,0% в группе сравнения ($p = 1,000$) при среднем сроке наблюдения 2,2 и 2,4 года соответственно. Все рецидивы развились только у пациентов с положительными интраоперационными посевами, при этом в подгруппе с верифицированной латентной инфекцией частота рецидивов составила 14,3% в обеих группах. Рецидивы были ассоциированы с полимикробным характером инфекции.

Таким образом, разработанная технология изготовления лиофилизированного остеопластического материала с пролонгированной элюцией ванкомицина продемонстрировала высокую эффективность как в экспериментальных, так и в клинических условиях. Оригинальный материал

обеспечивал создание локальных концентраций антибиотика, многократно превышающих МИК для резистентных штаммов, в течение двух недель, демонстрировал выраженные остеокондуктивные свойства и клиническую эффективность, сопоставимую с современным синтетическим материалом, на фоне значимого сокращения продолжительности операции и возможности замещения дефектов большего объема. Полученные результаты позволяют считать перспективным разработанный остеопластический материал с пролонгированной антимикробной активностью для внедрения в клиническую практику лечения хронического остеомиелита с полостными дефектами костей верхних и нижних конечностей при условии успешного завершения всех этапов регистрационных исследований и получении необходимых разрешительных документов.

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 свежзамороженной 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 биокomпозитным 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АБ – антибактериальные (средства, свойства)
- АВФ – аппарат внешней фиксации
- АМ – антимикробный (в сочетании «АМ спейсер»)
- АМА – антимикробная активность
- в/в – внутривенно
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГА – гидроксиапатит
- ГА/К – гидроксиапатит/коллаген
- ГБК – головки бедренных костей
- Гр(-) – грамотрицательные (бактерии)
- ДМСО – диметилсульфоксид
- кДНК – комплементарная ДНК
- КНС – коагулазонегативные стафилококки
- КОЕ – колониеобразующие единицы
- КОЕ/г – колониеобразующие единицы на грамм ткани
- КТ – компьютерная томография
- КЦ – костный цемент
- МБИ – микробиологическое исследование
- МЗ РФ – Министерство здравоохранения Российской Федерации
- МИК – минимальная ингибирующая концентрация
- МКИ – межквартильный интервал
- ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки
- МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография
- н/д – ниже предела обнаружения (не определяется)
- ОГ – основная группа
- ОЗ – остеозамещающий (материал)
- ОМ – остеомиелит (в тексте – хронический остеомиелит)

ПВП – поливинилпирролидон

ПЛГА – сополимер молочной и гликолевой кислот

ПММА – полиметилметакрилат

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР РВ – ПЦР в реальном времени

ПЭЭК – полиэфирэфиркетон

РХО – радикальная хирургическая обработка

РХООО – радикальная хирургическая обработка остеомиелитического очага

СанПиН – санитарные правила и нормы

СК – сульфат кальция

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

СРБ – С-реактивный белок

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТКФ/ГА – композиция трикальцийфосфата и гидроксиапатита

ФК – фосфаты кальция

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭДС – энергодисперсионная спектроскопия

ANOVA (analysis of variance) – дисперсионный анализ

ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) – Американское общество по изучению костной ткани и минерального обмена

ATCC (American Type Culture Collection) – Американская коллекция типовых культур

AUC (area under the concentration-time curve) – площадь под фармакокинетической кривой

AUC0-14 (area under the concentration-time curve from 0 to 14 days) – площадь под фармакокинетической кривой от 0 до 14 дней

B.Pm (bone perimeter) – периметр кости

BMP2 (bone morphogenetic protein 2) – костный морфогенетический белок 2

- ClfA/ClfB (clumping factor A/B) – факторы слипания А/В
- Cna (collagen adhesin) – коллаген-связывающий белок *S. aureus*
- CO₂ (carbon dioxide) – углекислый газ
- CoNS (coagulase negative staphylococci) – коагулазонегативные стафилококки
- CRP (C-reactive protein) – С-реактивный белок
- ddH₂O (double distilled water) – бидистиллированная вода
- DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine) – цифровые изображения и коммуникации в медицине
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) – модифицированная среда Игла в модификации Дульбекко
- eDNA (extracellular DNA) – внеклеточная ДНК
- EEC (European Economic Community) – Европейское экономическое сообщество (Директива 86/609/EEC)
- EPS (extracellular polymeric substance) – внеклеточный полимерный матрикс биопленки
- EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) – Европейский комитет по тестированию антимикробной чувствительности
- FCS (fetal calf serum) – эмбриональная телячья сыворотка
- FnBPA/FnBPB (fibronectin binding proteins A/B) – фибронектин-связывающие белки А/В
- H3F3 (histone H3.3 gene) – ген гистона H3.3
- HBsAg (hepatitis B surface antigen) – поверхностный антиген гепатита В
- HIV (human immunodeficiency virus) – вирус иммунодефицита человека
- hPa (hectopascal) – гектопаскаль
- HSD (honestly significant difference) – честно значимая разница (критерий Тьюки)
- HU (Hounsfield units) – единицы Хаунсфилда
- IL 1, IL 6 (interleukin 1/6) – интерлейкин 1, интерлейкин 6
- Inf.Ar (inflammation area) – площадь воспаления
- Inf.Ar/T.Ar (inflammation area/total area ratio) – соответствующий относительный индекс (%)

ISO (International Organization for Standardization) – Международная организация по стандартизации

ln (natural logarithm) – натуральный логарифм

McF (McFarland standard) – стандарт мутности МакФарланда

MDR (multidrug resistant) – множественная лекарственная устойчивость

MMLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase) – обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей Молони

MPR (multiplanar reconstruction) – мультипланарная реконструкция

MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) – метициллин-резистентный золотистый стафилококк

MRSE (methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis*) – метициллин-резистентный эпидермальный стафилококк

MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) – микробные поверхностные компоненты, распознающие адгезивные матричные молекулы

MSSA (methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*) – метициллин-чувствительный золотистый стафилококк

MTT тест (MTT assay) – тест жизнеспособности клеток на основе 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиевого бромид

Nc.B.Pm (necrotic bone perimeter) – периметр некротической кости

Nc.B.Pm/B.Pm (necrotic bone perimeter/bone perimeter ratio) – соответствующий относительный индекс (%)

Ob.Pm (osteoblast perimeter) – периметр остеобластов

Ob.Pm/B.Pm (osteoblast perimeter/bone perimeter ratio) – соответствующий относительный индекс (%)

Oc.Pm (osteoclast perimeter) – периметр остеокластов

Oc.Pm/B.Pm (osteoclast perimeter/bone perimeter ratio) – соответствующий относительный индекс (%)

OLCN (osteocytic lacuno-canalicular network) – остеоцитарная лакунарно-канальцевая сеть

PBS (phosphate buffered saline) – фосфатно-солевой буфер

PEEK (polyether ether ketone) – полиэфирэфиркетон

PMMA (polymethyl methacrylate) – полиметилметакрилат

PVP (polyvinylpyrrolidone) – поливинилпирролидон

qPCR (quantitative real-time PCR) – количественная ПЦР в реальном времени

R² (coefficient of determination) – коэффициент детерминации

RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor κ B Ligand) – лиганд рецептора активатора ядерного фактора κ B

RDW (red cell distribution width) – ширина распределения эритроцитов

RUNX2 (Runt-related transcription factor 2) – транскрипционный фактор RUNX2

SCV/SCVs (small colony variant/s) – малые колонии

SpA (staphylococcal protein A) – стафилококковый белок А

T.Ar (total area) – общая площадь

TNF α (tumor necrosis factor alpha) – фактор некроза опухоли α

VISA (vancomycin intermediate S. aureus) – ванкомицин-промежуточный S. aureus

VRT (volume rendering technique) – метод объёмной визуализации

β -TCP (beta-tricalcium phosphate) – β -трикальцийфосфат

χ^2 (chi-square test) – критерий хи-квадрат

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анастасиева, Е.А. Использование ауто- и аллотрансплантатов для замещения костных дефектов при резекциях опухолей костей / Е.А. Анастасиева, М. А. Садовой, А.А. Воропаева [и др.] // Травматология и ортопедия России. – 2017. – Т. 23, № 3. – С. 148–155.
2. Анастасиева, Е.А. Замещение костных дефектов тканеинженерной конструкцией на основе депротеинизированной губчатой кости: экспериментальное исследование / Е.А. Анастасиева, Л.А. Черданцева, Т.Г. Толстикова [и др.] // Гений ортопедии. – 2023. – Т. 29, № 6. – С. 602–608.
3. Бердиярова, Ш.Ш. Диагностика и лечение гематогенного остеомиелита / Ш.Ш. Бердиярова, Ф.А. Даминов, Д.Х. Дўстмуродова // Research Focus. – 2023. – № 5. – С. 213–218.
4. Божкова, С.А. Клинико-экономическая эффективность использования Фосфомицина и Ванкомицина для импрегнации спейсеров при хирургическом лечении пациентов с перипротезной инфекцией / С.А. Божкова, Р.М. Тихилов, А.А. Божкова [и др.] // Забайкальский медицинский вестник. – 2017. – № 2. – С. 122–131.
5. Воробьев, К.А. Современные способы обработки и стерилизации аллогенных костных тканей (обзор литературы) / К.А. Воробьев, А.В. Божко, В.М. Тихенко [и др.] // Травматология и ортопедия России. – 2017. – Т. 23, № 3. – С. 134–147.
6. Гостищев, В.К. Основные принципы этиотропной терапии хронического остеомиелита / В.К. Гостищев // Хирургия. – 1999. – № 9. – С. 38–42.
7. Гринев, М.В. Остеомиелит / М.В. Гринев. – Ленинград: Медицина. Ленингр. отд-ние, 1977.
8. Кавалерский, Г.М. Травматология и ортопедия / Г.М. Кавалерский, Л.Л. Силин, А.В. Гаркави [и др.]; под ред. Г.М. Кавалерского. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва: Издательский центр «Академия», 2008. – ISBN: 978-5-7695-5520-6.

9. Касимова, А.Р. Двенадцатилетняя динамика спектра ведущих возбудителей ортопедической инфекции: ретроспективное исследование / А.Р. Касимова, С.А. Божкова, Р.М. Тихилов [и др.] // Травматология и ортопедия России. – 2024. – Т. 30, № 1. – С. 66–75.
10. Кирилова, И.А. Деминерализованный костный трансплантат как стимулятор остеогенеза: современные концепции / И.А. Кирилова // Хирургия позвоночника. – 2004. – № 3. – С. 105–110.
11. Леончук, Д.С. Хронический посттравматический остеомиелит плеча: экономические аспекты лечения методом чрескостного остеосинтеза аппаратом Илизарова / Д.С. Леончук, Н.М. Ключин, А.М. Ермаков [и др.] // Гений ортопедии. – 2017. – № 1. – С. 74–79.
12. Ливенцов, В.Н. Трудноизлечимая перипротезная инфекция тазобедренного сустава: результаты saniрующих операций / В.Н. Ливенцов, С.А. Божкова, В.А. Артюх [и др.] // Травматология и ортопедия России. – 2019. – Т. 25, № 4. – С. 88–97.
13. Миронов, С.П. Хронический посттравматический остеомиелит как проблема современной травматологии и ортопедии (обзор литературы) / С.П. Миронов, А.В. Цискарашвили, Д.С. Горбатюк // Гений ортопедии. – 2019. – Т. 25, № 4. – С. 610–621.
14. Никитин, Г.Д. Хирургическое лечение остеомиелита / Г.Д. Никитин, А.В. Рак, С.А. Линник [и др.]. – СПб.: Русская графика, 2000. – 288 с.
15. Трушин, П.В. Хронический остеомиелит трубчатых костей: современный взгляд на проблему / П.В. Трушин, М.П. Разин // Вятский медицинский вестник. – 2023. – Т. 77, № 1. – С. 114–119.
16. Цискарашвили, А.В. Результаты микробиологического мониторинга ведущих возбудителей при инфицированных переломах длинных костей в условиях чрескостного остеосинтеза / А.В. Цискарашвили, Р.Э. Меликова, А.Г. Назаренко // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 2025. – Т. 32, № 2. – С. 457–475.

17. Шипицына, И.В. Мониторинг ведущей грамположительной микрофлоры и ее антибиотикочувствительности у лиц с хроническим остеомиелитом за трехлетний период / И.В. Шипицына, Е.В. Осипова // Гений ортопедии. – 2022. – Т. 28, № 2. – С. 189–193.
18. Akiyama, T. Incidence and risk factors for mortality of vertebral osteomyelitis: a retrospective analysis using the Japanese diagnosis procedure combination database / T. Akiyama, H. Yasunaga, H. Horiguchi [et al.] // BMJ Open. – 2013. – Vol. 3, N 3. – P. e002412.
19. Alt, V. Local delivery of antibiotics in the surgical treatment of bone infections / V. Alt, J. Franke, R. Schnettler // Techniques in Orthopaedics. – 2015. – Vol. 30, N 4. – P. 230–235.
20. An, Y.H. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces / Y.H. An, R.J. Friedman // J. Biomed. Mater. Res. – 1998. – Vol. 43, N 3. – P. 338–348.
21. Anagnostakos, K. Therapeutic Use of Antibiotic-loaded Bone Cement in the Treatment of Hip and Knee Joint Infections / K. Anagnostakos // J. Bone Jt. Infect. – 2017. – Vol. 2, N 1. – P. 29–37.
22. Anagnostakos, K. Antibiotic-loaded cement spacers—lessons learned from the past 20 years / K. Anagnostakos, B. Fink // Expert Review of Medical Devices. – 2018. – Vol. 15, N 3. – P. 231–245.
23. Anagnostakos, K. Antibiotic Elution from Hip and Knee Acrylic Bone Cement Spacers: A Systematic Review / K. Anagnostakos, C. Meyer // Biomed. Res. Int. – 2017. – Vol. 2017. – P. 4657874.
24. Anagnostakos, K. Antibiotic-impregnated bone grafts in orthopaedic and trauma surgery: a systematic review of the literature / K. Anagnostakos, K. Schroder // Int. J. Biomater. – 2012. – Vol. 2012. – P. 538061.
25. Becker, K. Coagulase-negative staphylococci / K. Becker, C. Heilmann, G. Peters // Clin. Microbiol. Rev. – 2014. – Vol. 27, N 4. – P. 870–926.
26. Berglund, B. Bone allograft impregnated with tobramycin and vancomycin delivers antibiotics in high concentrations for prophylaxis against bacteria commonly

associated with prosthetic joint infections / B. Berglund, M. Sörensen, P. Weidenhielm [et al.] // Microbiol. Spectr. – 2024. – Vol. 12, N 12. – P. e0041424.

27. Berreta, R.S. Beta-lactam-resistant *Staphylococcus aureus* in spinal osteomyelitis and spondylodiscitis: current landscape in antibiotic resistance, treatment, and complications / R.S. Berreta, J. Lee, A.F. Cristante [et al.] // Journal of Neurosurgery: Spine. – 2023. – Vol. 38, N 6. – P. 758–763.

28. Bertelli, A.M. *Staphylococcus aureus* protein A enhances osteoclastogenesis via TNFR1 and EGFR signaling / A.M. Bertelli, S. Delpino, N. Lattar [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. – 2016. – Vol. 1862, N 10. – P. 1975–1983.

29. Bezstarosti, H. Management of critical-sized bone defects in the treatment of fracture-related infection: a systematic review and pooled analysis / H. Bezstarosti, W.J. Metsemakers, E.M.M. van Lieshout [et al.] // Arch. Orthop. Trauma Surg. – 2021. – Vol. 141, N 7. – P. 1215–1230.

30. Brady, R.A. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection / R.A. Brady, J.G. Leid, J.H. Calhoun [et al.] // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2008. – Vol. 52, N 1. – P. 13–22.

31. Bunea, A. In vivo systemic vancomycin determination from polymethyl methacrylate and morselized bone allograft used in two stage septic knee revision arthroplasty / A. Bunea, V. Cristea, G. Dimitriu [et al.] // Germs. – 2024. – Vol. 14, N 3. – P. 294–300.

32. Calhoun, J.H. Adult osteomyelitis / J.H. Calhoun, M.M. Manring // Infect. Dis. Clin. North Am. – 2005. – Vol. 19, N 4. – P. 765–786.

33. Cancienne, J.M. Applications of Local Antibiotics in Orthopedic Trauma / J.M. Cancienne, M.D. Tyrrell Burrus, D.B. Weiss, S.R. Yarbboro // Orthop. Clin. North Am. – 2015. – Vol. 46, N 4. – P. 495–510.

34. Cao, Z. Repair of Infected Bone Defects with Hydrogel Materials / Z. Cao, C. Bian, W. Hu [et al.] // Polymers (Basel). – 2024. – Vol. 16, N 2. – P. 281.

35. Carbonell-Rosell, C. Etiology and antimicrobial resistance patterns in chronic osteomyelitis of the tibia: an 11-year clinical experience / C. Carbonell-Rosell,

M. Pigrau-Serrallach, D. Sánchez-Doblado [et al.] // Arch. Orthop. Trauma Surg. – 2024. – Vol. 144, N 2. – P. 773–781.

36. Carniello, V. Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth / V. Carniello, B.W. Peterson, H.C. van der Mei, H.J. Busscher // Adv. Colloid Interface Sci. – 2018. – Vol. 261. – P. 1–14.

37. Chen, J. Modification of polyether ether ketone for the repairing of bone defects / J. Chen, Z. Zhu, H. Chen [et al.] // Biomed. Mater. – 2022. – Vol. 17, N 4. – P. 042001.

38. Claro, T. Staphylococcus aureus protein A binds to osteoblasts and triggers signals that weaken bone in osteomyelitis / T. Claro, A. Widaa, M. O'Seaghdha [et al.] // PloS one. – 2011. – Vol. 6, N 4. – P. e18748.

39. Cong, Y. Vancomycin resistant Staphylococcus aureus infections: A review of case updating and clinical features / Y. Cong, S. Yang, X. Rao // J. Adv. Res. – 2020. – Vol. 21. – P. 169–176.

40. Coraca-Huber, D.C. Lyophilized allogeneic bone tissue as an antibiotic carrier / D.C. Coraca-Huber, M. Hausdorfer, M. Fille [et al.] // Cell Tissue Bank. – 2016. – Vol. 17, N 4. – P. 629–642.

41. Coraca-Huber, D.C. The use of vancomycin-loaded poly-l-lactic acid and poly-ethylene oxide microspheres for bone repair: an in vivo study / D.C. Coraca-Huber, R. Steixner, M. Nogler, A. Gonzalez // Clinics (Sao Paulo). – 2012. – Vol. 67, N 7. – P. 793–798.

42. Coraca-Huber, D.C. Effect of two cleaning processes for bone allografts on gentamicin impregnation and in vitro antibiotic release / D.C. Coraca-Huber, M. Fille, M. Hausdorfer [et al.] // Cell Tissue Bank. – 2013. – Vol. 14, N 2. – P. 221–229.

43. Coraça-Huber, D.C. Lyophilized human bone allograft as an antibiotic carrier: an in vitro and in vivo study / D.C. Coraça-Huber, A. Wurm, M. Fille [et al.] // Antibiotics. – 2022. – Vol. 11, N 7. – P. 969.

44. Day, R. Iontophoresis as a means of delivering antibiotics into allograft bone / R. Day, S. Megson, D. Wood // The Journal of Bone & Joint Surgery British Volume. – 2005. – Vol. 87, N 11. – P. 1568–1574.

45. De Araujo, F.P. Staphylococcus aureus clones causing osteomyelitis: a literature review (2000–2020) / F.P. De Araujo, A.P.M. Madalena, D.C. Ferreira [et al.] // Journal of global antimicrobial resistance. – 2021. – Vol. 26. – P. 29–36.
46. de Mesy Bentley, K.L. Chronic Osteomyelitis with Staphylococcus aureus Deformation in Submicron Canaliculi of Osteocytes: A Case Report / K.L. de Mesy Bentley, E. Trombetta-eSilva, R. Nishiyama [et al.] // JBJS Case Connect. – 2018. – Vol. 8, N 1. – P. e8.
47. de Mesy Bentley, K.L. Evidence of Staphylococcus aureus deformation, proliferation, and migration in canaliculi of live cortical bone in murine models of osteomyelitis / K.L. de Mesy Bentley, R. Trombetta, K. Nishitani [et al.] // J. Bone Miner. Res. – 2017. – Vol. 32, N 5. – P. 985–990.
48. Del Pino, P.L. Incidence and mortality of osteomielitis in Spain according to the basic minimum data set / P.L. Del Pino, A.G. Espejo // Medicina Clínica (English Edition). – 2019. – Vol. 153, N 11. – P. 418–423.
49. Dendoncker, K. Struggling with a cefazolin impregnation protocol of bone chips / K. Dendoncker, C. De Maeyer, N. Desmet [et al.] // Cell Tissue Bank. – 2025. – Vol. 26, N 2. – P. 11.
50. Downey, E.A. Prophylaxis and treatment of infection in long bones using an antibiotic-loaded ceramic coating with interlocking intramedullary nails / E.A. Downey, O.M. Omar, P.J. Mandrekar [et al.] // J. Bone Jt. Infect. – 2022. – Vol. 7, N 2. – P. 101–107.
51. Dragosloveanu, S. Microbiological Profiles, Antibiotic Susceptibility Patterns and the Role of Multidrug-Resistant Organisms in Patients Diagnosed with Periprosthetic Joint Infection over 8 Years: Results from a Single-Center Observational Cohort Study from Romania / S. Dragosloveanu, C.M. Dragosloveanu, C.D. Stanca [et al.] // Microorganisms. – 2025. – Vol. 13, N 5. – P. 1168.
52. Dudareva, M. The microbiology of chronic osteomyelitis: Changes over ten years / M. Dudareva, M. Hotchen, M.A. McNally [et al.] // J. Infect. – 2019. – Vol. 79, N 3. – P. 189–198.

53. Dvorak, J.E. Fracture related infection and sepsis in orthopedic trauma: A review / J.E. Dvorak, H.R. Lester, P.J. Maluso [et al.] // *Surgery*. – 2024. – Vol. 176, N 2. – P. 535–540.
54. Egawa, S. Efficacy of Antibiotic-Loaded Hydroxyapatite/Collagen Composites Is Dependent on Adsorbability for Treating *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis in Rats / S. Egawa, Y. Hirai, H. Matsumoto [et al.] // *J. Orthop. Res.* – 2020. – Vol. 38, N 4. – P. 843–851.
55. Eid, A.J. Osteomyelitis: review of pathophysiology, diagnostic modalities and therapeutic options / A.J. Eid, E.F. Berbari // *J. Med. Liban.* – 2012. – Vol. 60, N 1. – P. 51–60.
56. Ene, R. Review of calcium-sulphate-based ceramics and synthetic bone substitutes used for antibiotic delivery in PJI and osteomyelitis treatment / R. Ene, C. Nica, D. Ene [et al.] // *EFORT Open Rev.* – 2021. – Vol. 6, N 5. – P. 297–304.
57. Farnsworth, C.W. Increased Orthopaedic Infection Severity in Obesity/Type 2 Diabetes is Associated with Impaired Humoral Immunity and *Staphylococcus aureus* Adaptation to the Host / C.W. Farnsworth. – University of Rochester, 2017.
58. Gimza, B.D. Mechanisms of Antibiotic Failure During *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis / B.D. Gimza, J.E. Cassat // *Front. Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 638085.
59. Glaser, C. Chronische Infektionen des Skelettsystems Bildgebende Diagnostik: Bildgebende Diagnostik / C. Glaser, M. Matzko, M. Reiser // *Der Radiologe*. – 2000. – Vol. 40, N 6. – P. 547–556.
60. Glaudemans, A. Consensus document for the diagnosis of peripheral bone infection in adults: a joint paper by the EANM, EBJIS, and ESR (with ESCMID endorsement) / A. Glaudemans, C. Löwik, A. Gemmel [et al.] // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. – 2019. – Vol. 46, N 4. – P. 957–970.
61. Glehr, M. Vancomycin Elution Kinetics from Antibiotic Augmented Allograft and Resorbable Synthetic Bone Filler Superior to Antibiotic Augmented Bone Cement: An in Vitro Study over 42 Days / M. Glehr, A. Leithner, J. Friesenbichler [et al.] // *Orthopaedic Proceedings*. – 2024. – Vol. 106-B, N SUPP_19. – P. 87.

62. Gothi, R. A comparative evaluation of freeze dried bone allograft and decalcified freeze dried bone allograft in the treatment of intrabony defects: A clinical and radiographic study / R. Gothi, R.K. Bansal, M. Kaushik [et al.] // J. Indian Soc. Periodontol. – 2015. – Vol. 19, N 4. – P. 411–415.
63. Grassi, F.R. Design Techniques to Optimize the Scaffold Performance: Freeze-dried Bone Custom-made Allografts for Maxillary Alveolar Horizontal Ridge Augmentation / F.R. Grassi, R. Grassi, T. Vivarelli [et al.] // Materials (Basel). – 2020. – Vol. 13, N 6. – P. 1393.
64. Gristina, A. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. 1987 / A. Gristina // Clin. Orthop. Relat. Res. – 2004. – Vol. 427. – P. 4–12.
65. Gustilo, R.B. Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones: retrospective and prospective analyses / R.B. Gustilo, J.T. Anderson // J. Bone Joint Surg. Am. – 1976. – Vol. 58, N 4. – P. 453–458.
66. Hall-Stoodley, L. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases / L. Hall-Stoodley, J.W. Costerton, P. Stoodley // Nat. Rev. Microbiol. – 2004. – Vol. 2, N 2. – P. 95–108.
67. Hasan, R. An Antibiotic-Releasing Bone Void Filling (ABVF) Putty for the Treatment of Osteomyelitis / R. Hasan, K. Wohlers, N. Shreffler [et al.] // Materials (Basel). – 2020. – Vol. 13, N 22. – P. 5198.
68. Hatzenbuehler, J. Diagnosis and management of osteomyelitis / J. Hatzenbuehler, T.J. Pulling // Am. Fam. Physician. – 2011. – Vol. 84, N 9. – P. 1027–1033.
69. Howden, B.P. Reduced vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications / B.P. Howden, J.K. Davies, P.D. Johnson [et al.] // Clin. Microbiol. Rev. – 2010. – Vol. 23, N 1. – P. 99–139.
70. Hung, C.-H. Epidemiology of fatal/non-fatal suicide among patients with chronic osteomyelitis (COM): a nationwide population-based study / C.-H. Hung, T.-C.

Chiu, Y.-H. Liu [et al.] // *Journal of International Medical Research*. – 2020. – Vol. 48, N 6. – P. 0300060520919238.

71. Issa, K. The Epidemiology of Vertebral Osteomyelitis in the United States From 1998 to 2013 / K. Issa, B. Pourtaheri, A. Vijapura [et al.] // *Clin. Spine Surg.* – 2018. – Vol. 31, N 2. – P. E102–E108.

72. Itokazu, M. Treatment of osteomyelitis by using antibiotic-loaded porous ceramic / M. Itokazu, T. Matsunaga, D. Kumazawa, W. Yang // *Bioceramics: Volume 12*. – World Scientific, 1999. – P. 3–6.

73. Iwamoto, M. Trends in invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections / M. Iwamoto, Y. Mu, R. Lynfield [et al.] // *Pediatrics*. – 2013. – Vol. 132, N 4. – P. e817–e824.

74. Jiang, N. Single-stage debridement with implantation of antibiotic-loaded calcium sulphate in 34 cases of localized calcaneal osteomyelitis / N. Jiang, S.-J. Wu, J.-J. Lin [et al.] // *Acta Orthop.* – 2020. – Vol. 91, N 3. – P. 353–359.

75. Johnson, A.F. Antibiotic Treatment, Mechanisms for Failure, and Adjunctive Therapies for Infections by Group A *Streptococcus* / A.F. Johnson, C.N. LaRock // *Front. Microbiol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 760255.

76. Kalinka, J. *Staphylococcus aureus* isolates from chronic osteomyelitis are characterized by high host cell invasion and intracellular adaptation, but still induce inflammation / J. Kalinka, M. Hachmeister, J. Geraci [et al.] // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2014. – Vol. 304, N 8. – P. 1038–1049.

77. Karger, C. Treatment of posttraumatic bone defects by the induced membrane technique / C. Karger, T. Kishi, L. Schneider [et al.] // *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* – 2012. – Vol. 98, N 1. – P. 97–102.

78. Kavanagh, N. Staphylococcal Osteomyelitis: Disease Progression, Treatment Challenges, and Future Directions / N. Kavanagh, E.E. Ryan, A. Widaa [et al.] // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2018. – Vol. 31, N 2. – P. e00084-17.

79. Kawaguchi, K. The recent bacterial etiology of childhood osteoarticular infections focusing on the vaccine initiation for *Streptococcus pneumoniae* and

Haemophilus influenzae: A single-center retrospective analysis in Japan / K. Kawaguchi, H. Noda, K. Katsumi [et al.] // J. Orthop. – 2022. – Vol. 31. – P. 6–12.

80. Kehrer, M. Increasing incidence of pyogenic spondylodiscitis: a 14-year population-based study / M. Kehrer, C. Pedersen, T.G. Jensen, A.T. Lassen // J. Infect. – 2014. – Vol. 68, N 4. – P. 313–320.

81. Kim, S. Influence of Porosity on Fracture Toughness and Fracture Behavior of Antibiotic-Loaded PMMA Bone Cement / S. Kim, C. Bishop, A. Squire [et al.] // J. Biomech. Eng. – 2022. – Vol. 144, N 1. – P. 011006.

82. Krauss, J.L. Staphylococcus aureus Infects Osteoclasts and Replicates Intracellularly / J.L. Krauss, P.M. Roper, A. Ballard [et al.] // mBio. – 2019. – Vol. 10, N 5. – P. e02447-19.

83. Kremers, H.M. Trends in the epidemiology of osteomyelitis: a population-based study, 1969 to 2009 / H.M. Kremers, M.E. Nwojo, J.E. Ransom [et al.] // J. Bone Joint Surg. Am. – 2015. – Vol. 97, N 10. – P. 837–845.

84. Kuehn, K.D. Acrylic bone cements: composition and properties / K.D. Kuehn, W. Ege, U. Gopp // Orthop. Clin. North Am. – 2005. – Vol. 36, N 1. – P. 17–28.

85. Lari, A. Single versus two-stage management of long-bone chronic osteomyelitis in adults: a systematic review and meta-analysis / A. Lari, F. Alherz, M. Nouri [et al.] // Journal of orthopaedic surgery and research. – 2024. – Vol. 19, N 1. – P. 351.

86. Lew, D.P. Osteomyelitis / D.P. Lew, F.A. Waldvogel // Lancet. – 2004. – Vol. 364, N 9431. – P. 369–379.

87. Li, Y. An intelligent vancomycin release system for preventing surgical site infections of bone tissues / Y. Li, X. Liu, L. Li [et al.] // Biomater. Sci. – 2020. – Vol. 8, N 11. – P. 3202–3211.

88. Loughman, A. Roles for fibrinogen, immunoglobulin and complement in platelet activation promoted by Staphylococcus aureus clumping factor A / A. Loughman, J.R. Fitzgerald, M.P. Brennan [et al.] // Mol. Microbiol. – 2005. – Vol. 57, N 3. – P. 804–818.

89. Lucas-Aparicio, J. Silicon-calcium phosphate ceramics and silicon-calcium phosphate cements: Substrates to customize the release of antibiotics according to the idiosyncrasies of the patient / J. Lucas-Aparicio, D. Manchón, C. Rueda [et al.] // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* – 2020. – Vol. 106. – P. 110173.
90. Ma, S. Improving osseointegration and antimicrobial properties of titanium implants with black phosphorus nanosheets-hydroxyapatite composite coatings for vascularized bone regeneration / S. Ma, Y. Wei, R. Luo [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* – 2024. – Vol. 112, N 4. – P. e35403.
91. Mader, J.T. Staging and staging application in osteomyelitis / J.T. Mader, M. Shirtliff, J.H. Calhoun // *Clin. Infect. Dis.* – 1997. – Vol. 25, N 6. – P. 1303–1309.
92. Masrouha, K.Z. A novel treatment approach to infected nonunion of long bones without systemic antibiotics / K.Z. Masrouha, M.E. Raad, S.S. Saghie // *Strategies in Trauma and Limb Reconstruction.* – 2018. – Vol. 13, N 1. – P. 13–18.
93. Masters, E.A. Skeletal infections: microbial pathogenesis, immunity and clinical management / E.A. Masters, R.P. Trombetta, K.L. de Mesy Bentley [et al.] // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2022. – Vol. 20, N 7. – P. 385–400.
94. McLaren, A.C. Alternative materials to acrylic bone cement for delivery of depot antibiotics in orthopaedic infections / A.C. McLaren // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 2004. – Vol. 427. – P. 101–106.
95. McNally, M.A. Single-stage treatment of chronic osteomyelitis with a new absorbable, gentamicin-loaded, calcium sulphate/hydroxyapatite biocomposite: a prospective series of 100 cases / M.A. McNally, J.Y. Ferguson, A.C. Lau [et al.] // *Bone Joint J.* – 2016. – Vol. 98-B, N 9. – P. 1289–1296.
96. McNally, M.A. Mid- to long-term results of single-stage surgery for patients with chronic osteomyelitis using a bioabsorbable gentamicin-loaded ceramic carrier / M.A. McNally, J.Y. Ferguson, R.A. Kugan [et al.] // *Bone Joint J.* – 2022. – Vol. 104-B, N 9. – P. 1095–1100.
97. McNeil, J.C. Acute Hematogenous Osteomyelitis in Children: Clinical Presentation and Management / J.C. McNeil // *Infection and drug resistance.* – 2020. – Vol. 13. – P. 4459–4473.

98. Mehkri, Y. Osteomyelitis of the spine: treatments and future directions / Y. Mehkri, J. Pannu, E. Gendreau [et al.] // *Infectious diseases research*. – 2022. – Vol. 3, N 1. – P. 10.
99. Metsemakers, W.-J. The global burden of fracture-related infection: can we do better? / W.-J. Metsemakers, T.F. Moriarty, M.H.J. Verhofstad [et al.] // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2024. – Vol. 24, N 6. – P. e386–e393.
100. Metsemakers, W.J. Fracture-related infection: A consensus on definition from an international expert group / W.J. Metsemakers, M. Morgenstern, M.A. McNally [et al.] // *Injury*. – 2018. – Vol. 49, N 3. – P. 505–510.
101. Metsemakers, W.J. General treatment principles for fracture-related infection: recommendations from an international expert group / W.J. Metsemakers, M. Morgenstern, I. Senneville [et al.] // *Arch. Orthop. Trauma Surg.* – 2020. – Vol. 140, N 8. – P. 1013–1027.
102. Michalak, K.A. Iontophoresed segmental allografts in revision arthroplasty for infection / K.A. Michalak, D. Khoo, S.W. Yates [et al.] // *J. Bone Joint Surg. Br.* – 2006. – Vol. 88, N 11. – P. 1430–1437.
103. Monaco, M. Worldwide epidemiology and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* / M. Monaco, F. Pimentel de Araujo, M. Cruciani [et al.] // *Staphylococcus aureus: microbiology, pathology, immunology, therapy and prophylaxis*. – 2016. – P. 21–56.
104. Moriarty, T.F. Bone infection: a clinical priority for clinicians, scientists and educators / T.F. Moriarty, W.J. Metsemakers, M. Morgenstern [et al.] // *Eur. Cell Mater.* – 2021. – Vol. 42. – P. 312–333.
105. Mthethwa, P.G. The microbiology of chronic osteomyelitis in a developing world setting / P.G. Mthethwa, L. Marais // *SA Orthopaedic Journal*. – 2017. – Vol. 16, N 2. – P. 39–45.
106. Museru, L.M. Chronic osteomyelitis: a continuing orthopaedic challenge in developing countries / L.M. Museru, C.N. McHaro // *Int. Orthop.* – 2001. – Vol. 25, N 2. – P. 127–131.

107. Nandi, S.K. Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review / S.K. Nandi, S. Roy, P. Mukherjee [et al.] // *Indian J. Med. Res.* – 2010. – Vol. 132, N 1. – P. 15–30.
108. Nasser, A. A comprehensive review of bacterial osteomyelitis with emphasis on *Staphylococcus aureus* / A. Nasser, T. Azimi, S. Ostadmohammadi, S. Ostadmohammadi // *Microb. Pathog.* – 2020. – Vol. 148. – P. 104431.
109. O'Connor, O. How Much Does an Infected Fracture Cost? / O. O'Connor, A. Thahir, M. Krkovic // *Arch. Bone Jt. Surg.* – 2022. – Vol. 10, N 2. – P. 135–140.
110. Olson, M.E. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics / M.E. Olson, H. Ceri, D.W. Morck [et al.] // *Can. J. Vet. Res.* – 2002. – Vol. 66, N 2. – P. 86–92.
111. Ornaghi, H.L., Jr. A Review on Polymers for Biomedical Applications on Hard and Soft Tissues and Prosthetic Limbs / H.L. Ornaghi, Jr., F.M. Monticeli, L.D. Agnol // *Polymers (Basel)*. – 2023. – Vol. 15, N 19. – P. 4034.
112. Otto, M. *Staphylococcus epidermidis*—the 'accidental' pathogen / M. Otto // *Nature reviews microbiology*. – 2009. – Vol. 7, N 8. – P. 555–567.
113. Paharik, A.E. The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response / A.E. Paharik, A.R. Horswill // *Microbiol. Spectr.* – 2016. – Vol. 4, N 2. – P. 529–566.
114. Parvizi, J. Periprosthetic joint infection: the economic impact of methicillin-resistant infections / J. Parvizi, B. Adeli, B. Zmistowski [et al.] // *J. Arthroplasty*. – 2010. – Vol. 25, N 6 Suppl. – P. 103–107.
115. Patti, J.M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues / J.M. Patti, B.L. Allen, M.J. McGavin, M. Höök // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1994. – Vol. 48. – P. 585–617.
116. Peeters, A. Current Insights in the Application of Bone Grafts for Local Antibiotic Delivery in Bone Reconstruction Surgery / A. Peeters, G. Putzeys, L. Thorrez // *J. Bone Jt. Infect.* – 2019. – Vol. 4, N 5. – P. 245–253.
117. Peltola, H. Acute osteomyelitis in children / H. Peltola, M. Paakkonen // *N. Engl. J. Med.* – 2014. – Vol. 370, N 4. – P. 352–360.

118. Philippe, D. Use of a Porous Alumina Antibiotic-Loaded Ceramic to Treat Bone Defect and Bone Infection After Road Trauma / D. Philippe, T. Lopes, V. Decombe [et al.] // JAAOS Global Research & Reviews. – 2022. – Vol. 6, N 6. – P. e21.

119. Pincher, B. A systematic review of the single-stage treatment of chronic osteomyelitis / B. Pincher, C. Fenton, R. Jeyapalan [et al.] // J. Orthop. Surg. Res. – 2019. – Vol. 14, N 1. – P. 393.

120. Popovich, K.J. SHEA/IDSA/APIC Practice Recommendation: Strategies to prevent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission and infection in acute-care hospitals: 2022 Update / K.J. Popovich, A. Aureden, A.M. Ham [et al.] // Infect. Control Hosp. Epidemiol. – 2023. – Vol. 44, N 7. – P. 1039–1067.

121. Proctor, R.A. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus* / R.A. Proctor, B. Kahl, C. von Eiff [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 1995. – Vol. 20, N 1. – P. 95–102.

122. Proctor, R.A. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections / R.A. Proctor, C. von Eiff, B.C. Kahl [et al.] // Nature Reviews Microbiology. – 2006. – Vol. 4, N 4. – P. 295–305.

123. Prokes, L. Allogeneic Bone Impregnated with Biodegradable Depot Delivery Systems for the Local Treatment of Joint Replacement Infections: An In Vitro Study / L. Prokes, S. Grunwald, S. Haas [et al.] // Molecules. – 2022. – Vol. 27, N 19. – P. 6487.

124. Qi, D. Development of high-strength porous polyetheretherketone foam/nanosilver antibacterial composites for the prevention of postoperative infections in bone repair / D. Qi, J. Gao, J. Zhang [et al.] // Composites Communications. – 2022. – Vol. 31. – P. 101127.

125. Radwan, N.H. Chitosan-calcium phosphate composite scaffolds for control of post-operative osteomyelitis: Fabrication, characterization, and in vitro-in vivo evaluation / N.H. Radwan, M. Nasr, R.A.F. Ishak [et al.] // Carbohydr. Polym. – 2020. – Vol. 244. – P. 116482.

126. Rani, S.A. Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states / S.A.

Rani, B. Pitts, H. Beyenal [et al.] // Journal of bacteriology. – 2007. – Vol. 189, N 11. – P. 4223–4233.

127. Rathbone, C.R. Effect of various concentrations of antibiotics on osteogenic cell viability and activity / C.R. Rathbone, J.D. Cross, K.V. Brown [et al.] // Journal of Orthopaedic Research. – 2011. – Vol. 29, N 7. – P. 1070–1074.

128. Rosanova, M.T. Estudio descriptivo de infecciones osteo-articulares en niños en tiempos de Staphylococcus aureus resistente a meticilina de la comunidad (SARM-Co) / M.T. Rosanova, R. Agosta, M.S. Sberna [et al.] // Revista chilena de infectología. – 2015. – Vol. 32, N 3. – P. 321–325.

129. Rozis, M. Orthopedic Implant-Related Biofilm Pathophysiology: A Review of the Literature / M. Rozis, D.S. Evangelopoulos, S.G. Pneumaticsos // Cureus. – 2021. – Vol. 13, N 6. – P. e15634.

130. Rybak, M.J. Therapeutic monitoring of vancomycin for serious methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections: a revised consensus guideline and review by the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists / M.J. Rybak, J. Le, T.P. Lodise [et al.] // American Journal of Health-System Pharmacy. – 2020. – Vol. 77, N 11. – P. 835–864.

131. Samsell, B. Preservation of allograft bone using a glycerol solution: a compilation of original preclinical research / B. Samsell, J. Softic, M. Qin [et al.] // Biomater. Res. – 2019. – Vol. 23, N 1. – P. 5.

132. Scherr, T.D. Staphylococcus aureus biofilms induce macrophage dysfunction through leukocidin AB and alpha-toxin / T.D. Scherr, M.L. Hanke, O. Huang [et al.] // MBio. – 2015. – Vol. 6, N 4. – P. e01021-15.

133. Schwarz, E.M. 2018 International Consensus Meeting on Musculoskeletal Infection: Research Priorities from the General Assembly Questions / E.M. Schwarz, R.J. McLaren, T.P. Sculco [et al.] // J. Orthop. Res. – 2019. – Vol. 37, N 5. – P. 997–1006.

134. Shi, X. Antibiotic-loaded calcium sulfate in clinical treatment of chronic osteomyelitis: a systematic review and meta-analysis / X. Shi, Y. Wu, H. Zhu [et al.] // J. Orthop. Surg. Res. – 2022. – Vol. 17, N 1. – P. 104.

135. Simpson, A.H. Chronic osteomyelitis. The effect of the extent of surgical resection on infection-free survival / A.H. Simpson, M. Deakin, J.M. Latham // *J. Bone Joint Surg. Br.* – 2001. – Vol. 83, N 3. – P. 403–407.

136. Singh, S. Explaining Osteomyelitis and Prosthetic Joint Infections (PJI) in terms of Biofilm - A Review / S. Singh, C.L. Tan, A.R. Ahmad // *Malays. Orthop. J.* – 2021. – Vol. 15, N 2. – P. 1–8.

137. Smolle, M.A. Vancomycin Elution Kinetics of Four Antibiotic Carriers Used in Orthopaedic Surgery: In Vitro Study over 42 Days / M.A. Smolle, A. Leithner, M. Glehr [et al.] // *Antibiotics (Basel)*. – 2023. – Vol. 12, N 11. – P. 1608.

138. Spaan, A.N. Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors / A.N. Spaan, J.A. van Strijp, V.J. Torres // *Nature Reviews Microbiology*. – 2017. – Vol. 15, N 7. – P. 435–447.

139. Stewart, P.S. Physiological heterogeneity in biofilms / P.S. Stewart, M.J. Franklin // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2008. – Vol. 6, N 3. – P. 199–210.

140. Stockmann, C. National trends in the incidence, outcomes and charges of pediatric osteoarticular infections, 1997-2012 / C. Stockmann, K. Ampofo, E.K. Killpack [et al.] // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2015. – Vol. 34, N 6. – P. 672–674.

141. Stoodley, P. Liquid flow in biofilm systems / P. Stoodley, D. Debeer, Z. Lewandowski // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1994. – Vol. 60, N 8. – P. 2711–2716.

142. Stoodley, P. Biofilms as complex differentiated communities / P. Stoodley, K. Sauer, D.G. Davies, J.W. Costerton // *Annual Reviews in Microbiology*. – 2002. – Vol. 56, N 1. – P. 187–209.

143. Subramanyam, K.N. Surgical management of chronic osteomyelitis: Organisms, recurrence and treatment outcome / K.N. Subramanyam, S. Mundargi, M.J. Venkatesan [et al.] // *Chin. J. Traumatol.* – 2023. – Vol. 26, N 4. – P. 228–235.

144. Tao, J. Injectable Chitosan-Based Thermosensitive Hydrogel/Nanoparticle-Loaded System for Local Delivery of Vancomycin in the Treatment of Osteomyelitis / J. Tao, Y. Zhang, A. Shen [et al.] // *Int. J. Nanomedicine*. – 2020. – Vol. 15. – P. 5855–5871.

145. Thakore, R.V. The Gustilo–Anderson classification system as predictor of nonunion and infection in open tibia fractures / R.V. Thakore, E.R. Francois, S.K. Nwosu [et al.] // *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*. – 2017. – Vol. 43, N 5. – P. 651–656.
146. Tucker, L.J. Physicochemical and Antimicrobial Properties of Thermosensitive Chitosan Hydrogel Loaded with Fosfomycin / L.J. Tucker, C. Grant, M.A. Valenzuela [et al.] // *Mar. Drugs*. – 2021. – Vol. 19, N 3. – P. 144.
147. Ueng, S.W. Management of femoral diaphyseal infected nonunion with antibiotic beads local therapy, external skeletal fixation, and staged bone grafting / S.W. Ueng, F.C. Wei, C.H. Shih // *J. Trauma*. – 1999. – Vol. 46, N 1. – P. 97–103.
148. Urish, K.L. Staphylococcus aureus Osteomyelitis: Bone, Bugs, and Surgery / K.L. Urish, J.E. Cassat // *Infect. Immun.* – 2020. – Vol. 88, N 7. – P. e00932-19.
149. Valotteau, C. Single-Cell and Single-Molecule Analysis Unravels the Multifunctionality of the Staphylococcus aureus Collagen-Binding Protein Cna / C. Valotteau, F.M. Banat, C.A. Mitchell [et al.] // *ACS Nano*. – 2017. – Vol. 11, N 2. – P. 2160–2170.
150. Vijayakumar, A. Microbiological and antibiotic profile of osteomyelitis in tertiary care hospital / A. Vijayakumar, M. Serva Peddha, K. Balamuruganvelu [et al.] // *International Surgery Journal*. – 2021. – Vol. 8, N 3. – P. 910–914.
151. von Heideken, J. A 10-year retrospective survey of acute childhood osteomyelitis in Stockholm, Sweden / J. von Heideken, K. Iversen, D. Finnbogason [et al.] // *J. Paediatr. Child Health*. – 2020. – Vol. 56, N 12. – P. 1912–1917.
152. Wagner, C. Post-traumatic osteomyelitis: analysis of inflammatory cells recruited into the site of infection / C. Wagner, G.M. Hänsch, S. Stegmaier [et al.] // *Shock*. – 2003. – Vol. 20, N 6. – P. 503–510.
153. Walter, N. The Epidemiology of Osteomyelitis in Children / N. Walter, M. Rupp, T. Hierl [et al.] // *Children (Basel)*. – 2021. – Vol. 8, N 11. – P. 1000.
154. Wang, X. Current data on extremities chronic osteomyelitis in southwest China: epidemiology, microbiology and therapeutic consequences / X. Wang, S. Yu, D. Sun [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7, N 1. – P. 16251.

155. Wassif, R.K. Recent advances in the local antibiotics delivery systems for management of osteomyelitis / R.K. Wassif, M. Elkayal, R.N. Shamma, S.A. Elkheshen // *Drug Deliv.* – 2021. – Vol. 28, N 1. – P. 2392–2414.
156. Weiss, L. Declining Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Septic Arthritis and Osteomyelitis in Children: Implications for Treatment / L. Weiss, A.S. Lansell, J. Figueroa [et al.] // *Antibiotics (Basel).* – 2020. – Vol. 9, N 3. – P. 101.
157. Whitchurch, C.B. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation / C.B. Whitchurch, G.G. Geesey, Z. Lewandowski [et al.] // *Science.* – 2002. – Vol. 295, N 5559. – P. 1487.
158. Widaa, A. *Staphylococcus aureus* protein A plays a critical role in mediating bone destruction and bone loss in osteomyelitis / A. Widaa, T. Claro, T.J. Foster [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, N 7. – P. e40586.
159. Wilson, C.J. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review / C.J. Wilson, R.E. Clegg, D.I. Leavesley, M.J. Percy // *Tissue Eng.* – 2005. – Vol. 11, N 1-2. – P. 1–18.
160. Winkler, H. Rationale for one stage exchange of infected hip replacement using uncemented implants and antibiotic impregnated bone graft / H. Winkler // *Int. J. Med. Sci.* – 2009. – Vol. 6, N 5. – P. 247–252.
161. Winkler, H. Allograft bone as antibiotic carrier / H. Winkler, P. Haiden // *Journal of bone and joint infection.* – 2017. – Vol. 2, N 1. – P. 52–62.
162. Winkler, H. In vitro release of vancomycin and tobramycin from impregnated human and bovine bone grafts / H. Winkler, O. Janata, C. Berger [et al.] // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2000. – Vol. 46, N 3. – P. 423–428.
163. Winkler, H. Vancomycin graft composite for infected bone defects / H. Winkler, O. Janata, A. Georgopoulos // *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology.* – 1999. – Vol. 9, N 4. – P. 253–256.
164. Winkler, H. Bone grafts impregnated with antibiotics as a tool for treating infected implants in orthopedic surgery—one stage revision results / H. Winkler, K.

Stoiber, F. Kaudela [et al.] // *Cell and tissue banking*. – 2006. – Vol. 7, N 4. – P. 319–323.

165. Witsø, E. Cancellous bone as an antibiotic carrier / E. Witsø, L. Persen, P. Benum, G. Bergh // *Acta Orthopaedica Scandinavica*. – 2000. – Vol. 71, N 1. – P. 80–84.

166. Wright, J.A. Interaction of staphylococci with bone / J.A. Wright, S.P. Nair // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2010. – Vol. 300, N 2-3. – P. 193–204.

167. Wu, S. An injectable and antibacterial calcium phosphate scaffold inhibiting *Staphylococcus aureus* and supporting stem cells for bone regeneration / S. Wu, X. Ma, X. Wang [et al.] // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* – 2021. – Vol. 120. – P. 111688.

168. Wu, S. Mini Review Therapeutic Strategies Targeting for Biofilm and Bone Infections / S. Wu, B. Xu, Y. Dai [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 936285.

169. Xu, L. Preparation and characterisation of a gellan gum-based hydrogel enabling osteogenesis and inhibiting *Enterococcus faecalis* / L. Xu, D. Li, Q. Li [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2020. – Vol. 165, Pt B. – P. 2964–2973.

170. Yang, D. Novel insights into *Staphylococcus aureus* deep bone infections: the involvement of osteocytes / D. Yang, G. Wijenayaka, L.B. Solomon [et al.] // *MBio*. – 2018. – Vol. 9, N 2. – P. e00415-18.

171. Yu, Y.H. A Three-Dimensional Printed Polycaprolactone Scaffold Combined with Co-Axially Electrospun Vancomycin/Ceftazidime/Bone Morphological Protein-2 Sheath-Core Nanofibers for the Repair of Segmental Bone Defects During the Masquelet Procedure / Y.H. Yu, Y.J. Lee, N.Y. Chen [et al.] // *Int. J. Nanomedicine*. – 2020. – Vol. 15. – P. 913–925.

172. Zahar, A. Use of antibiotic-impregnated bone grafts in a rabbit osteomyelitis model / A. Zahar, D. Kendoff, T.A. Klatte, T. Gehrke // *Technol. Health Care*. – 2017. – Vol. 25, N 5. – P. 929–938.

173. Zapata, D. Nanotechnology in the Diagnosis and Treatment of Osteomyelitis / D. Zapata, L. Higgs, B. Smith [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14, N 8. – P. 1563.

174. Zhang, T. Sustainable release of vancomycin from micro-arc oxidised 3D-printed porous Ti6Al4V for treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bone infection and enhancing osteogenesis in a rabbit tibia osteomyelitis model / T. Zhang, Q. Wei, H. Zhou [et al.] // *Biomater. Sci.* – 2020. – Vol. 8, N 11. – P. 3106–3115.
175. Zhang, T. Paediatric Osteomyelitis and Septic Arthritis Pathogen Distribution and Antimicrobial Resistance in a Single Centre: A 15-Year Retrospective Analysis / T. Zhang, W. Dou, X. Wang [et al.] // *J. Trop. Pediatr.* – 2022. – Vol. 68, N 3. – P. fmac038.
176. Zhou, C.H. One-stage debridement and bone transport versus first-stage debridement and second-stage bone transport for the management of lower limb post-traumatic osteomyelitis / C.H. Zhou, X.H. Ren, A.A. Ali [et al.] // *J. Orthop. Translat.* – 2021. – Vol. 28. – P. 21–27.
177. Zimmerli, W. Orthopaedic biofilm infections / W. Zimmerli, P. Sendi // *APMIS.* – 2017. – Vol. 125, N 4. – P. 353–364.
178. Zimmerli, W. Prosthetic-joint infections / W. Zimmerli, A. Trampuz, P.E. Ochsner // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol. 351, N 16. – P. 1645–1654.