

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННО БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ ИМ. Н.Н. ПРИОРОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Меликова
Регина Энверпашаевна

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛИМЕРНЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ,
ИМПРЕГНИРОВАННЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ,
ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ОСТЕОМИЕЛИТЕ
(экспериментальное исследование)

3.1.8 - Травматология и ортопедия

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
к.м.н. Цискарашвили А.В.

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	12
1.1. Актуальность проблемы	12
1.2. Этиология костно-суставной инфекции.....	14
1.3. Микробные биопленки.....	16
1.4. Лечение костно-суставной инфекции	19
1.5. Костный цемент на основе полиметилметакрилата	20
1.6. Биодegradируемые депо-системы.....	29
1.6.1. Природные полимеры	29
1.6.2. Костно-пластический материал	31
1.6.3. Керамические биокomпозиты.....	32
1.6.4. Синтетические полимеры	34
1.7. Резюме	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	37
2.1. Получение ненасыщенных производных поливинилового спирта	37
2.1.1 Получение образцов, содержащих антибиотики	39
2.1.1.1 Получение образцов на основе костного цемента	39
2.1.1.2. Получение образцов на основе полимерного гидрогеля.....	39
2.1.3. Измерение модуля сдвига (упругости) образцов гидрогелей	40
2.1.4. Изучение динамики выделения включённых биологически активных веществ из объема образцов.....	42
2.1.4.1. Построение калибровочных зависимостей концентрации антибиотиков от оптической плотности	42
2.1.4.2. Изучение динамики выделения импрегнированных антибактериальных препаратов из сравниваемых образцов.....	44
2.1.4.3. Выбор импрегнируемых антибактериальных препаратов для изучения элюционных свойств исследуемых образцов	45
2.2. In vitro исследование антимикробной активности образцов на основе полимерного гидрогеля и костного цемента, импрегнированных антибиотиками.....	45
2.2.1. Изготовление образцов из полимерного гидрогеля, насыщенных антимикробным препаратом.....	45

2.2.2. Изготовление образцов на основе костного цемента, насыщенных антимикробным препаратом.....	47
2.2.3. Выбор импрегнируемых антибактериальных препаратов для изучения антимикробной активности исследуемых матриц.....	48
2.2.4. Культивирование основных возбудителей костно-суставной инфекции.....	49
2.2.5. Оценка антимикробной активности сравниваемых образцов в отношении тест-культур	50
2.3. In vivo исследование эффективности полимерных гидрогелей.....	51
2.3.1. Общая характеристика экспериментального этапа.....	51
2.3.2. Техника моделирования хронического остеомиелита большеберцовой кости кролика	54
2.3.3. Техника хирургической санации с имплантацией исследуемых матриц, импрегнированных антибактериальным препаратом.....	55
2.3.3.1. Интраоперационное изготовление полимерного гидрогеля и костного цемента	59
2.3.4. Клинико-лабораторное исследование	60
2.3.5. Лучевые методы исследования	60
2.3.6. Микробиологическое исследование	61
2.3.7. Гистологическое исследование	61
2.3.7.1. Парафиновая гистологическая проводка	61
2.3.7.2. Метод костных шлифов	61
2.3.7.3. Морфометрическая оценка гистопатологических признаков остеомиелита	62
2.3.8. Статистический анализ полученных данных.....	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ IN VITRO ИССЛЕДОВАНИЙ.....	65
3.1. Результаты сравнительной характеристики элюционных свойств материалов на основе костного цемента и полимерного гидрогеля	65
3.1.2. Резюме по результатам in vitro исследования элюционных свойств тестируемых образцов материалов	78
3.2. Результаты микробиологического исследования антимикробной активности сравниваемых образцов	81
3.2.1. Антибактериальная активность препаратов в составе полимерного гидрогеля и костного цемента в отношении <i>S. aureus</i>	81

3.2.1.1. <i>MSSA</i> и антимикробная активность гентамицина, импрегнированного в полимерный гидрогель и костный цемент.....	81
3.2.1.2. <i>MRSA</i> и антимикробная активность ванкомицина, импрегнированного в полимерный гидрогель и костный цемент.....	84
3.2.2. Антибактериальная активность препаратов в составе полимерного гидрогеля и костного цемента в отношении <i>S. epidermidis</i>	88
3.2.2.1. <i>MSSE</i> и антимикробная активность цефазолина, импрегнированного в полимерный гидрогель и костный цемент.....	88
3.2.2.2. <i>MRSE</i> и антимикробная активность ванкомицина, импрегнированного в полимерный гидрогель и костный цемент.....	91
3.2.3. Антимикробная активность сравниваемых образцов, импрегнированных тобрамицином, в отношении <i>A. baumannii</i>	93
3.2.4. Резюме по результатам <i>in vitro</i> исследования антимикробной активности тестируемых образцов материалов	95
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ IN VIVO ИССЛЕДОВАНИЯ.....	99
4.1. Модель хронического остеомиелита большеберцовой кости кроликов	99
4.2. Результаты хирургического лечения экспериментального хронического остеомиелита большеберцовой кости в изучаемых группах	105
4.2.1. Клиническая оценка локального статуса оперированной конечности и общего состояния кроликов.....	105
4.2.2. Результаты лабораторных показателей крови	115
4.2.3. Результаты лучевого исследования	118
4.2.4. Результаты микробиологического исследования.....	126
4.2.5. Результаты гистологического исследования	128
4.2.6. Результаты морфометрического исследования.....	148
4.3. Резюме по результатам <i>in vivo</i> исследования	151
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	161
ВЫВОДЫ	165
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	166
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	167
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	169

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертационного исследования

Хронический остеомиелит и перипротезная инфекция, как составляющие ортопедической инфекции, являются грозным и разрушительным осложнением. Частота костно-суставной инфекции ежегодно растет, что связано с ростом числа тяжелой механической травмы, хирургической активности, расширением показаний к проведению операций по замене суставов, а также ятрогенными дефектами лечения [15, 17, 63, 64, 90]. Так доля хронического остеомиелита составляет 3–25 % от всех заболеваний опорно-двигательной системы [25], перипротезной инфекции после первичной операции - 0,3–2,4 % [85] и после ревизионного эндопротезирования - 6–8 % [9].

Общей чертой в лечении хронического остеомиелита длинных костей и перипротезной инфекции суставов является тщательная хирургическая санация очага с удалением девитализированных костной и мягких тканей, адекватное дренирование раны и применение местной и системной антибактериальной терапии. Местная терапия обеспечивается за счет локальных транспортных систем, осуществляющих доставку антибиотиков непосредственно в очаг инфекции. Наиболее распространенной в клинической практике депо-системой является костный цемент на основе полиметилметакрилата [109, 118, 209] несомненным достоинством которого считается механическая прочность. Однако ряд имеющихся недостатков такие как: высокая токсичность летучих паров метилметакрилата [43, 47]; высокая температура реакции полимеризации, ограничивающая спектр антибиотиков возможных для импрегнации, а также способной вызвать некроз костной и мягкотканых структур на этапе имплантации [136, 212]; гидрофобная поверхность, не препятствующая адгезии микроорганизмов к своей поверхности и формированию ими микробных биопленок; элюция до 10 % препарата от его общего импрегнированного объема [135, 152];

неравномерное распределение антибиотиков в цементной матрице, приводящее к неравномерному высвобождению загруженного противомикробного агента; изменение гарантийных свойств цемента при его кустарном изготовлении [66]; необходимость повторной операции по его удалению, сопровождающаяся дополнительной травматизацией и потерей костной и мягких тканей [6, 10, 143], - не позволяют считать его оптимальной локальной транспортной системой.

Несмотря на совершенствование оперативных методик, и возможность влиять на порогенность костного цемента, частота рецидивов при применении цементной матрицы по-прежнему сохраняется на высоком уровне, в целом колеблясь в пределах от 6,3 до 38,9 % [24, 27, 31, 32, 34, 41, 200, 203].

Актуальность проблем, связанных с полиметилметакрилатом, по сей день является движущим элементом к поискам учеными новых депо-матриц, которые бы были лишены всех недостатков костного цемента и обладали бы свойствами близкими к идеальной локальной транспортной системе.

Цель исследования: изучить в *in vitro* условиях элюционные и антибактериальные свойства депо-систем на основе полимерных гидрогелей, импрегнированных антибиотиками, в *in vivo* условиях - способность эффективно и стойко купировать инфекционно-воспалительный процесс.

Задачи исследования:

1. В лабораторных *in vitro* условиях изучить максимально допустимые концентрации импрегнируемых антибактериальных препаратов на 5 мл объема полимерного гидрогеля, определить его элюционные характеристики и провести сравнительный анализ с костным цементом.
2. В *in vitro* условиях оценить антибактериальную активность полимерного гидрогеля, импрегнированного различными группами антибиотиков, в отношении ведущих возбудителей ортопедической инфекции и провести сравнительный анализ с костным цементом.

3. В *in vivo* условиях изучить и сравнить эффективность купирования экспериментальной модели хронического остеомиелита большеберцовой кости на модели кроликов при имплантации полимерного гидрогеля и костного цемента, импрегнированных антибактериальным препаратом.
4. Оценить влияние полимерного гидрогеля и ПММА, импрегнированных антибактериальным препаратом, на костную ткань при имплантации в костномозговой канал большеберцовой кости на модели кроликов.

Научная новизна

Создание новых биodeградируемых гидрофильных локальных транспортных систем на основе ненасыщенных производных поливинилового спирта, обладающих контролируемым высвобождением импрегнированных лекарственных агентов, многократно превосходящих элюционный и противомикробный потенциал костного цемента на протяжении длительного периода времени.

Научно-практическая значимость

Полимерные гидрогели на основе ПВС являются оптимальной локальной депо-системой, которые обладают пролонгированным высоким высвобождающим антибиотик потенциалом, обеспечивающим эффективную антибактериальную активность в отношении возбудителей ортопедической инфекции по сравнению с ПММА, что способствует стойкому купированию инфекционно-воспалительного процесса.

Применение в клинической практике полимерных гидрогелей, насыщенных антибиотиками, в перспективе позволят снизить риск развития инфекционных осложнений после проведенного оперативного вмешательства и улучшить исходы лечения ортопедической инфекции не только за счет высокого высвобождающего и антимикробного потенциала, но и за счет гидрофильности, препятствующей адгезии микроорганизмов к собственной поверхности имплантата и формированию ими микробных биопленок.

Биодеградируемость полимерного гидрогеля исключит необходимость повторной госпитализации пациента для выполнения оперативного вмешательства по его удалению, что значительно сократит затраты на лечение. Простая техника изготовления путем смешивания трех составных компонентов и быстрое время отверждения материала (5-15 сек) позволят сократить длительность операции. Отсутствие высвобождения токсичного мономера в процессе сшивки гидрогеля делает его применение безопасным для окружающего медицинского персонала, а отсутствие реакции полимеризации не ограничивает спектр антибиотиков, которые можно импрегнировать в его состав, и не вызовет некроз костной и мягких тканей при его имплантации. Вдобавок, возможность управления консистенцией гидрогеля (сделать более упругим или гелеобразным путем снижения концентрации добавляемых иницирующих составных компонентов) и придания ему различной конфигурации позволит заполнить любой формы и объема костно- и мягкотканые полости.

Депо-система на основе полимерного гидрогеля обладает всеми перспективами дальнейшего ее применения в клинической практике не только при лечении ортопедических и других инфекционных осложнений, но и в целях профилактики, ввиду чего требуется ее исследование в клинических условиях.

Методология и методы исследования

Методология исследования построена на последовательном поэтапном исследовании основных свойств, характеристик и эффективности применения полимерного гидрогеля на основе ненасыщенных производных поливинилового спирта, импрегнированных различными группами антибактериальных препаратов, как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*, который является потенциальной локальной транспортной системой для доставки лекарственных средств непосредственно в очаг инфекции.

В работе использованы следующие методы исследования:

- спектрофотометрический,
- клинический,
- лабораторный,
- лучевой метод диагностики (рентгенография),
- микробиологический,
- гистоморфометрический,
- статистический.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Полимерные гидрогели на основе поливинилового спирта, импрегнированные антибиотиками, обладают высокими элюционными свойствами и антибактериальной активностью, многократно превышающие высвобождающий и бактерицидный потенциал костного цемента на протяжении длительного периода времени.
2. Имплантация полимерного гидрогеля, содержащего активный в отношении возбудителя противомикробный агент, в очаг инфекции способствует эффективному стойкому подавлению хронического остеомиелита большеберцовой кости в экспериментальной модели на кроликах.
3. Полимерный гидрогель, ввиду отсутствия при сшивке низкомолекулярного токсичного мономера и материал-ассоциированной резорбции костной ткани, не оказывает влияния и не нарушает остеорепаративные процессы.
4. Постепенная биоразлагаемость гидрогелевого материала, не требующая повторного оперативного вмешательства по его удалению, и гидрофильная поверхность снижают риск адгезии микроорганизмов к собственной поверхности имплантата и формирования ими микробных биопленок, тем самым снижая риск появления резистентных штаммов и рецидива инфекции, что выгодно отличает его от костного цемента.

Апробация и реализация результатов исследования

Результаты материалов выполненной диссертационной работы доложены на региональных, общероссийских и международных научных конференциях: VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием ПРИОРОВСКИЕ ЧТЕНИЯ 2020 «Последствия травм и инфекционные осложнения костей и суставов» (Москва, 2020), III конгрессе ОРТОБИОЛОГИЯ 2022 «От исследования к клинической практике» (Москва, 2022), XIV Международной научно-практической конференции «Образование и наука для устойчивого развития» (Москва, 2022), XII Всероссийском Съезде травматологов-ортопедов (Москва, 2022), IV конгрессе ОРТОБИОЛОГИЯ 2023 «Patient Cases – от теории к практике» (Москва, 2023), Илизаровские чтения – 2023 «Лечение и медицинская реабилитация пострадавших с высокоэнергетическими повреждениями и их последствиями» (Курган, 2023).

По материалам диссертации опубликовано 4 печатные работы, в том числе 2 статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации научных результатов диссертационных исследований и в международных базах цитирования (Scopus), получены 2 патента РФ на изобретения.

Степень достоверности результатов проведенного исследования. Достоверность данных исследования опирается на многократные параллельные исследования одних и тех же образцов с содержанием одного и того же вида антибактериального агента, современные методы диагностики и методы статистической обработки данных.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. По своей структуре и содержанию диссертация полностью соответствует научной специальности: 3.1.8 – травматология, ортопедия.

Личный вклад автора

Диссертантом выполнен самостоятельный анализ профильной отечественной и зарубежной научной литературы и создан дизайн

исследования. Автор также принимал непосредственное активное участие во всех *in vitro* и *in vivo* этапах диссертационной работы, провел статистическую обработку полученных результатов исследований и их интерпретацию, сформулировал выводы и практические рекомендации, написал все главы диссертации и ее автореферат.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты *in vitro* и *in vivo* этапов диссертационного исследования являются многообещающими и перспективными и требуют дальнейшего исследования в клинической практике при лечении костно-суставных инфекционных осложнений у пациентов.

Объем и структура диссертации

Материалы диссертационного исследования представлены на 198 страницах. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы по материалам и методам исследования, двух глав собственного исследования, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Работа содержит 9 таблиц и 126 рисунков. Список литературы включает 218 источников: из них 70 – отечественных и 148 – иностранных авторов.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Актуальность проблемы

Рост числа костно-суставной инфекции за последнее десятилетие вызван всплеском частоты тяжелой механической травмы, хирургической активности, расширением показаний к проведению операций по замене суставов, а также ятрогенными дефектами лечения [15,17, 25, 90] такими как: несвоевременная и неполная первичная санация открытой раны, несоблюдение сроков и техники выполнения операций, неправильный выбор оперативного пособия и металлоконструкций, несоответствующих основным критериям биомеханической концепции и др. [63, 64]. Однако, несмотря на современные достижения и совершенствование оперативного пособия и технического оснащения, неудовлетворительные результаты лечения по-прежнему остаются на высоком уровне (10,3–57 %) [15], что в последующем приводит к инвалидизации и ухудшению качества жизни пациентов.

Хронический остеомиелит – достаточно грозное инфекционное неспецифическое гнойно-воспалительное осложнение, развивающееся в ранние или поздние сроки после ортопедических операций. Доля пациентов с остеомиелитом в структуре заболеваний опорно-двигательной системы составляет 3–5 % [37]. Наиболее частыми причинами, провоцирующими развитие остеомиелита суставов и костей, являются травмы (73,21 %) и послеоперационные инфекционные осложнения (15,03 %) [17]. Если у детей инфицирование костной ткани происходит гематогенным путем, то у взрослых преимущественно после травмы, либо после оперативного лечения [175]. Так по данным зарубежных источников, послеоперационный остеомиелит встречается в 2–22,4 % случаев [133].

Хронический остеомиелит вследствие перелома развивается в 5,3–75,4 % случаев, из которых 3–24 % возникают после открытых [95], 0,5–10 % – после закрытых [178]. По некоторым сведениям, доля остеомиелита после открытых переломов составляет 50–64 % [166, 209]. Наиболее часто инфекция

развивается в большеберцовой кости (52,7 %), вторую позицию занимает бедренная кость (24,9 %). Среди костей верхних конечностей инфекция поражает преимущественно плечевую кость (6 %), причем наиболее распространенной локализацией является проксимальная треть, ввиду ее анатомической предрасположенности к переломам. Поражение других костей встречается достаточно редко (17 %) [25]. Рецидивирование хронического остеомиелита отмечается в 10–40 % случаев [37].

Вторым видом костной инфекции является перипротезная инфекция суставов (ППИ), развивающаяся после артропластических оперативных вмешательств и быстро переходящая в хроническую форму при несвоевременной диагностике и неправильном лечении. В отчете шведского регистра за 2017 г. ППИ занимает первое место среди основных причин ранних ревизий протезированных суставов. Куковенко Г.А. с соавторами также сообщают об увеличении частоты ревизионных операций в 4,25 раза, выполненных по причине ППИ [31].

Согласно данным отечественных авторов, ППИ после первичного тотального эндопротезирования крупных суставов развивается в 5–6 % случаев [8], по зарубежным – в 0,3–3 % [40, 60]. После ревизионного эндопротезирования инфекционное осложнение встречается в 2,6–4,8 % случаев [21], а по другим сообщениям, в 15 % случаев [88]. При этом рецидив инфекции после реэндопротезирования, выполненного по поводу ППИ, составляет 36 % [21, 30, 39, 203].

Удельный вес ППИ, впервые развившейся после первичного и ревизионного эндопротезирования, в тазобедренном суставе достигает 0,25–1 % [27, 39, 157, 176] и 1,2–10 % [61] соответственно, в коленном - 1,6–2,5 % [120, 154] и 4–12 % [161] соответственно. Замена суставов верхних конечностей выполняется достаточно редко в силу их анатомических и функциональных особенностей. Однако при этом, ППИ протезированных плечевого и локтевого суставов встречается достаточно часто - в 2,9 и 5,3 % случаев соответственно [55].

При отсутствии своевременной диагностики и соответствующего лечения костно-суставной инфекции ее длительное течение способствует развитию вторичных осложнений таких как: амилоидоз почек, дистрофические изменения паренхиматозных органов, появление септикопиемических осложнений и др. [10].

Лечение костно-суставной инфекции – трудоемкий, длительный, многоэтапный процесс, требующий специального оборудования, высокой квалификации ортопеда [27] и пролонгированной антибактериальной терапии, нередко дорогостоящими препаратами, что сопровождается существенными экономическими затратами [16]. Так, стоимость лечения данного заболевания в США обходится в 50 000 \$ на одного пациента, в Великобритании - порядка 21 937 фунтов стерлингов [210]. По другим источникам, зарубежные госпитали на лечение расходуют от 20 000 до 60 000 €, в США – до 390 000 \$ [178]. При этом процент положительных исходов с сохранением конечности и ее функции остается крайне низким [16, 19]. Риск инвалидизации пациентов при неудовлетворительном исходе лечения высокий и достигает 50–90 % [37], смертность при этом составляет 2,5% [210]. Таким образом, данная патология является актуальной проблемой не только в экономическом, но и в социальном аспекте [178].

1.2. Этиология костно-суставной инфекции

В основе ортопедической инфекции лежат условно-патогенные и вирулентные микроорганизмы, попадающие в кость извне или гематогенно (7,5 %) [17], и способные образовывать микробные биопленки. Наиболее распространенными возбудителями в более 73,5 % наблюдений являются грамположительные бактерии (Грам(+)), среди которых ведущую позицию занимает *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) [29, 31, 65, 81, 138], далее в порядке убывания следуют *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) и представители рода *Enterococcus*. Однако метициллинрезистентные штаммы *S. epidermidis* (*MRSE*) по частоте идентификации преобладают над *S. aureus* (*MRSA*).

Грамотрицательные микроорганизмы (Грам(-)) (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* и др.) в этиологической структуре костно-суставной инфекции составляют 5–35 % [11, 82, 104], но, несмотря на незначительную долю, они вызывают тревогу во всем мире из-за тенденции к ежегодному росту не только их числа, но и антибиотикорезистентности [177]. В редких случаях источником инфекции являются анаэробы (2–4 %) [168] и грибковые микробы (2 %) [98], идентифицируемые, в основном, у пациентов с иммуносупрессией [48, 96, 166].

Помимо Грам(-) флоры в последние годы также настораживает и полимикробная инфекция (2 и более микроорганизмов), частота которой достигает 10–20 % [11, 65, 98]. К примеру, Venito N. с соавторами, базируясь на 6-летнем мониторинге (2004–2010 г.), сообщают о 5-кратном увеличении частоты идентификации микробных ассоциаций при костно-суставной инфекции [81].

Существуют ситуации, когда микроорганизмы, при наличии симптомов инфекционно-воспалительного процесса, не выявляются традиционными микробиологическими методами (чувствительность 20 %). Такая костно-суставная инфекция называется культуронегативной. Отрицательный результат посева не говорит о его «стерильности» и отсутствии костной инфекции [65]. Причины отрицательных бактериологических результатов, как правило, кроются в предшествовавшей антибактериальной терапии [8], нарушении техники забора биопсийного материала и его транспортировки, в медленнорастущих низковирулентных патогенах и анаэробах, требующих длительных сроков инкубации [40, 85], а также в трудном культивировании рутинными способами микроорганизмов грибковой природы [160]. К примеру, Klement R.M. с соавторами обнаружили, что при пролонгированной инкубации (14 дней и более) часто идентифицируется рост культур *Cutibacterium acnes* ($p=0,019$) [140]. Аналогичные результаты получены в ранее проведенных независимых исследованиях Schäfer и Schwotzger с

соавторами [181, 186]. Выявление грибковой микрофлоры возможно ПЦР методом, однако данный способ помогает идентифицировать микробы только в 46% наблюдений [168]. В подавляющем большинстве случаев основной причиной отрицательных бактериальных посевов при явной костной инфекции являются сложно диагностируемые микробные биопленки, которые требуют более подробного рассмотрения.

1.3. Микробные биопленки

Открытие биопленок явилось важнейшим достижением за последние 30 лет в микробиологии и медицине за XX столетие [26, 59]. Общая теория существования микроорганизмов в составе биопленок была сформулирована еще в 1978 году. К настоящему времени достоверно установлена этиологическая роль микробных биопленок в развитии 60–80 % хронических и рецидивирующих инфекций [18, 20, 35, 57, 126, 165].

Способность образовывать биопленки является одним из факторов патогенности Грам(+), Грам(-) бактерий и *Candida sp.* [18, 35, 56]. Так, исследования показали, что 40 % *S. epidermidis* обладают выраженной способностью к формированию биопленок в отличие от *S. aureus*, среди них преобладали штаммы *MRSE* (43,2 % против 21,4 % *MSSE*) [9]. В свою очередь *P. aeruginosa* более привержен к биопленкообразованию по сравнению с золотистым и эпидермальным стафилококками ($p < 0,05$) [42, 58].

Микробная биопленка представляет собой многоуровневые подвижные непрерывно обновляющиеся ассоциации тесно контактирующих друг с другом микроорганизмов одного или нескольких видов, связанных между собой внеклеточным матриксом. Синтез последнего детерминировано в ДНК самих бактерий и служит для защиты от воздействия факторов внешней среды [4, 56, 127]. Патогены в биопленках существуют в виде микроколоний по форме напоминающие башни или грибы, и занимающие 15–20 % ее объема, остальные 75–85 % пространства заполняет экзополисахаридный матрикс [18, 59]. В составе матрикса содержатся полисахариды (40–95 %), белки, липиды,

экстрацеллюлярные ДНК или РНК. При этом процентное содержание последних трех компонентов во внеклеточной субстанции может сильно варьировать [42, 85]. Экзополисахаридный состав матрикса способен меняться в зависимости от преобладания той или иной видовой принадлежности бактерий в биопленке. Так в случае Грам(+) штаммов в структуре преобладают катионные полимеры и тейхоевые кислоты, в случае Грам(-) – нейтральные или полианионные полимеры. Матрикс обеспечивает прочность биопленке, удерживая большое количество воды, защищает ее от дегидратации и играет важную роль в поддержании гомеостаза биопленки. Поверхностно расположенные во внеклеточном слое *г*-рамнолипиды, создают в биопленке собственную систему канальцев, обеспечивающую микроциркуляцию, перераспределение поступающих потоков органических и неорганических молекул и выведение продуктов метаболизма микробов [48, 56, 59]. По этим канальцам вглубь биопленки избирательно диффундируют низкомолекулярные соединения и задерживаются крупные молекулы, белки и частицы среды [35]. Кроме того, ультратонкая липидная мембраноподобная оболочка, покрывающая матрикс снаружи, придает биопленке дополнительную прочность, ограждает ее от воздействия специфических и неспецифических иммунных систем, лекарственных агентов и других неблагоприятных факторов [59, 99].

Формирование микробных биопленок - генетически запрограммированный процесс, протекающий в несколько последовательных этапов - от адгезии планктонных форм к поверхности кости или имплантата до созревания и дисперсии [18, 35, 48, 56, 68, 189]. Весь процесс занимает 12–18 часов [179]. Адгезия микробов к поверхности происходит за счет сил Ван-дер-Ваальса, гидрофобных и водородных связей, жгутиков, фимбрий, пилей бактерий, а также взаимодействия с белками «хозяина», в частности альбуминами [28, 49, 85].

Существование микроорганизмов в биопленках позволяет им обмениваться генетическим материалом резистентности и приобретать

высокую устойчивость к действию антибактериальных препаратов. При этом обмен генным материалом возможен не только между бактериями одного вида, но и разных видов. Такое коллективное поведение микробов, высокая степень координации экспрессии их генов и механизмов адаптации осуществляется посредством системы Quorum Sensing («чувство кворума») (QS-система). Существует предположение, что передача бактериальных плазмид в биопленках происходит в 10–500 раз чаще, чем в планктонной форме [4, 18, 35, 56, 59, 68]. Однако обмен плазмидами резистентности – не единственный механизм, обеспечивающий повышенную выживаемость клеток в составе микробной биопленки. По данным многих источников, наряду с конъюгацией, устойчивость может быть обусловлена и рядом других факторов:

- затрудненной, замедленной диффузией или неспособностью антибиотиков проникать вглубь экзополисахаридного матрикса [49, 85];
- связыванием и инактивацией антибиотиков полимерами, белками или модифицированными ферментами матрикса;
- снижением скорости деления и роста микробных клеток в биопленке, вследствие которой связь антибактериальных агентов с бактериями происходит значительно медленнее;
- наличием метаболически неактивных клеток–персистеров.

Поскольку в биопленке существует градиент по содержанию питательных веществ и кислорода, то на ее периферии находятся активно растущие клетки, а внутри - метаболически неактивные клетки–персистеры. Как известно, антибиотики воздействуют на быстро делящиеся микробы, поэтому внутри биопленок бактерии оказываются нечувствительными к воздействию препаратов. Несмотря на низкую плотность персистеров (менее 0,1%) в популяции микроорганизмов биопленки, их наличие считается наиболее вероятным механизмом повышенной устойчивости к антибиотикам [18]. Именно данные формы способны вызвать рецидив инфекции и могут стать потенциальными продуцентами резистентных клонов [35].

В дополнение ко всему источником реинфекции также может послужить и способность *S. aureus* к интернализации остеоцитарно-лакунарно-канальцевой сети кости [175], которая обуславливает формирование плотного минерального матрикса не только вокруг инфицированных остеобластов, но и остеокластов с нейтрофилами. Вследствие этого микробный агент десятилетиями может находиться в пораженной кости и оставаться незамеченным и недоступным для иммунной системы хозяина [156].

1.4. Лечение костно-суставной инфекции

К сожалению, не существует лекарственных средств, способных полностью элиминировать полноценные зрелые микробные биопленки [59]. Системная антибиотикотерапия, воздействуя на планктонные формы, лишь только препятствует их распространению в организме хозяина [56, 85]. Ввиду нарушенного кровоснабжения поврежденной кости, системное лечение антибиотиками не способно обеспечить необходимые концентрации в очаге инфекции [214, 216]. Как известно, поступление недостаточных локальных концентраций не препятствует восстановлению целостности биопленки сохранившимися фрагментами в течение 24 часов после ее механического разрушения [194]. Превышение же терапевтических доз антибиотиков чревато появлением нежелательных побочных эффектов. Следовательно, хирургическое лечение, заключающееся в удалении инородных тел (металлоконструкции, секвестров), радикальной санации очага с иссечением некротизированных и нежизнеспособных мягких и костных тканей с последующей системной антибактериальной терапией – неэффективный способ борьбы с микробными биопленками.

В силу патогенеза и этиологии костно-суставной инфекции возникла потребность в создании локальных концентраций антибиотиков в очаге инфекции, которые бы на протяжении длительного времени в 1000 раз и более превышали бы минимальные подавляющие концентрации (МПК) необходимые для планктонных форм [18, 56, 57, 59, 103, 214, 216]. Данную

функцию смогли обеспечить депо-системы, насыщенные антибактериальными препаратами.

На сегодняшний день существуют 2 группы локальных транспортных систем: недеградируемые (нерассасывающиеся) и биodeградируемые (рассасывающиеся). Наиболее распространенной и изученной несущей матрицей, которая в настоящее время может быть использована в клинической практике, является нерассывающийся костный цемент на основе полиметилметакрилата (ПММА).

1.5. Костный цемент на основе полиметилметакрилата

ПММА впервые был открыт в 1930 году. Спустя 30 лет Charnley J. использовал акриловый костный цемент для фиксации эндопротеза тазобедренного сустава. Buchholz et Gartmann в 1970 г предложили вариант комбинации костного цемента с антибиотиком [179, 214], именно с этого периода и началось успешное применение ПММА в ортопедии в качестве локальной антибактериальной транспортной системы.

Создание костного цемента, импрегнированного антибактериальным препаратом, явилось одним из революционных событий в мировой медицине. Уже на протяжении многих десятилетий ПММА широко применяется во всех мировых клиниках в профилактических и лечебных целях при костно-суставной инфекции.

Основу костного цемента составляют порошкообразный полимер и жидкий мономер [209]. Порошкообразный полимер представляет собой полимеризованный полиметилметакрилат с включениями привитого метакрилата – сополимера [85]. Для придания костному цементу свойства рентгеноконтрастности в порошкообразную фракцию добавляют двуокись циркония (Palacos) или бария сульфат (Simplex) [47]. Жидкая фракция представляет собой смесь мономеров (метилметакрилат, бутилметакрилат, бутилакрилат и др.), способной к самостоятельной медленной полимеризации (нагреванию), поэтому для предотвращения этой реакции в мономер

добавляют ингибитор гидрохинон. Третичный амин - N-N-диметил-паратолуидин в составе мономера необходим в качестве активатора реакции полимеризации [43].

Процесс формирования костного цемента проходит четыре основные фазы (смешивания, склеивания, рабочую фазу и затвердевания) и занимает в общей сложности 10 минут. При этом время каждой из фаз и скорость реакции полимеризации зависят от температуры окружающей среды в операционной: чем выше температура, тем быстрее протекают фазы и реакция.

В первые две фазы цементная масса не используется, поскольку в это время происходит испарение большей части токсичных паров метилметакрилата, которые могут оказать вредное влияние на контактные линзы, глаза и дыхательные пути оперирующего персонала и вызвать развитие контактного дерматита при попадании на кожу рук [43, 47]. Также возможно развитие таких системных эффектов как: гепатотоксичность, лабильность артериального давления, гипоксия и спутанность сознания [85, 102]. Следовательно, в процессе смешивания порошка с жидкостью и при использовании цемента в ходе операции необходимо предпринимать соответствующие меры безопасности. Работать с костным цементом можно только в рабочую фазу, когда значительно снижается выделение токсичных паров с поверхности цемента, а масса приобретает пластичные свойства и перестает прилипать к перчаткам. Одновременно с этим постепенно увеличивается скорость полимеризации (60–140 С°) [27], повышается вязкость массы, уменьшаются пластичные свойства и адгезия к костной ткани или имплантату. При этом значение температуры полимеризации зависит как от соотношения пропорций основных компонентов цемента, инициатора и активатора, так и от состава самой мономерной жидкости [43].

Существует 2 формы костного цемента: официальный, производимый в фабричных условиях, и «кустарный», изготавливаемый интраоперационно вручную [28, 39]. В фабричной форме ПММА антибиотик распределен равномерно, учитываются импрегнируемые дозы и термостабильные свойства

агента, его взаимодействие с матрицей на всех стадиях полимеризации, тем самым гарантируя неизменность свойств цемента в процессе смешивания и эксплуатации [70]. Недостатками данной формы являются ограниченный спектр (гентамицин, ванкомицин и тобрамицин) и низкие дозы используемых антибиотиков, а также дороговизна. К примеру, цена одной упаковки костного цемента, содержащего антибиотик, в среднем выше на 284–349 \$ по сравнению с чистым цементом [28].

Кустарные формы отличаются дешевизной, возможностью импрегнации различных доз антибиотиков, чувствительных к идентифицированным микроорганизмам, приданием различных форм, соответствующих полости костного дефекта, и прочной фиксацией к костной ткани. Минусами являются изменение гарантийных производителем свойств цемента, неравномерное распределение препарата в составе матрицы и увеличение длительности операции. Как правило, неравномерное смешивание приводит к неравномерному релизу антибиотика из цемента.

Смешивание кустарных форм можно производить вручную или вакуум-аппаратом [69]. При ручном способе смешивания в цементную массу попадают пузырьки воздуха [10], образующие макро- (>1 мм) и микропоры (<1 мм), что придает матрице порозную структуру [47]. Чем порознее структура цемента, тем выше релиз антибиотика и ниже его механическая прочность. Вакуум-аппаратное смешивание, напротив, способствует снижению порозности структуры и увеличению прочности ПММА [113, 114, 147]. Однако добавление антибиотика (1 г на 40 г ПММА) одинаково снижает прочность в обоих случаях [108].

Готовые низкодозовые (0,5–1,0 г на 40 г материала) формы в основном применяют в профилактических целях инфекционных костных осложнений [28, 39]. При этом результаты использования антибиотика в цементе в целях профилактики при первичной замене сустава достаточно противоречивы. В одних работах авторы сообщают о значимом снижении частоты инфекции при добавлении антибиотика в костный цемент [85, 179], другие отрицают эти

различия. Так, анализ трех крупных клинических проспективных рандомизированных исследований не обнаружил достоверных различий в частоте развития костной инфекции при использовании чистого цемента или цемента с антибиотиком при первичном эндопротезировании [69]. Сравнительно недавно проведенные мета-анализы 3000 и 6318 замен коленного сустава также пришли к подобному заключению [128, 182]. Вследствие чего FDA (*Food and Drug Administration*) в США категорически запретил применять антибиотикосодержащие цементы при первичной артропластике [10]. Более 95 % зарубежных и отечественных травматологов-ортопедов придерживаются данного мнения и считают оправданным применение готовой низкодозовой смеси только на втором этапе ревизии [69], исключением являются пациенты с существующим риском развития ППИ после первичной замены сустава. Такая точка зрения обусловлена еще и нежелательным снижением механической прочности цемента [87], потенциальным риском формирования антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов к импрегнируемым препаратам [209] и дорогостоящей антибиотиконасыщенной ПММА [28].

Для лечения костно-суставной инфекции используют цемент с высоким содержанием антибиотика (не менее 3,6 г на стандартные 40 г материала) [69], при этом цементные бусы должны содержать не менее 6-8 г препарата [5]. Однако четких рекомендаций относительно дозы импрегнируемого противомикробного агента в состав ПММА на сегодняшний день нет [10].

Антибиотики, загружаемые в состав костного цемента, имеют ряд требований: должны быть доступны в порошкообразной форме [27, 87], обладать термостабильностью, гидрофильностью, бактерицидностью с широким спектром действия, низким риском индукции резистентности и аллергии, способностью подавлять бактериальную флору в очаге инфекции в низких концентрациях и минимально проникать в системный кровоток во избежание развития побочных эффектов [51]. Исходя из вышеперечисленного, наиболее подходящими и распространенными препаратами для насыщения

являются гентамицин, ванкомицин (в Европе) и тобрамицин (в США) [209]. Последние два препарата начали применять сравнительно недавно.

Широкая распространенность гентамицина в качестве импрегнируемого агента обусловлена его способностью в течение первых 24-48 часов создавать локальные концентрации в очаге от 40 до 100 мг/л, при его низкой концентрации в сыворотке крови - 0,2-0,8 мг/л, что исключает возможность развития токсического эффекта [28]. В случае ванкомицина и тобрамицина (2 г и 3,6 г на 40 г ПММА соответственно) максимальная концентрация антибиотиков в сыворотке крови составляет менее 3 мг/л, что в разы ниже критического порога [69]. По влиянию на остеорепаративные свойства гентамицин более цитотоксичен: при концентрациях превышающих 100 мг/мл значительно снижается активность щелочной фосфатазы ($p < 0,05$), а при уровне ≥ 700 мг/мл вызывает гибель остеобластов. Тобрамицин оказывает негативное влияние на остеоиндуктивные свойства кости при концентрации ≥ 400 мг/мл, ванкомицин – при 1000 мг/мл [216]. Гибель клеток и в том, и в другом варианте запускается при уровне 10 000 мг/мл [69, 85].

Сам процесс высвобождения антибиотика из костного цемента протекает в 2 фазы. Двухфазность является общим свойством для всех типов костного цемента [71, 79, 152, 187, 212]. В первую фазу («взрывная», длится до 96 часов) релиз лекарственного агента происходит с поверхностных слоев цемента (порядка 50-100 мкм от поверхности имплантата) [109, 185] за счет микротрещин и омывания матрицы физиологическими жидкостями. В этой стадии элюируется большая часть импрегнированного препарата [10, 78, 85, 117, 130, 139, 145, 158, 190, 209]. Следующая фаза «продолжительная» характеризуется непродолжительной в 2-5 раз медленной элюцией препарата, вследствие минимального потенциала диффузии антимикробных частиц из цементной матрицы [119], в результате которой высвобождаются субингибирующие концентрации [83]. Последняя, как известно, чревата появлением резистентных штаммов бактерий [91, 101, 159, 163] и не препятствует обсеменению ими поверхности ПММА [10, 109, 152, 190, 195] и

формированию микробных биопленок [79, 209], тем самым индуцируя рецидив инфекции [51, 75, 87, 100, 202, 212].

Непродолжительный антимикробный эффект ПММА (от 4 ч до 4 суток), описанный в ряде научных работ [30, 84, 93, 100, 107, 131, 132, 148, 205] обусловлен в основном быстрым лекарственным истощением его поверхностных слоев. В целом, потенциал высвобождения лекарственных средств, импрегнированных в ПММА, несмотря на различные физико-химические характеристики загружаемых антибиотиков, тип цемента и способ изготовления, колебался от 0,05 % до 11 % [73, 74, 86, 101, 134, 139, 145, 148, 158, 172, 187], а по некоторым отдельным источникам достигал 17 % [87, 94, 146] и 36 % [119].

Многие ортопеды попытались решить проблему кратковременного высвобождения увеличением навески препарата, импрегнируемого в состав костного цемента, однако, как выяснилось, данный способ лишь незначительно повышает релиз антибактериального агента [79], поскольку способствует появлению в основном приповерхностных участков. Массоперенос лекарственного средства из цементной матрицы, независимо от степени его насыщения, очень низкий [158]. К примеру, увеличение исходной концентрации гентамицина в 8 раз повысило элюцию всего на 11% [94]. При включении 6 г ванкомицина в 60 г ПММА доступными оказываются лишь десятки миллиграммов лекарственного средства [158]. 4-кратное повышение навески ванкомицина в костном цементе пролонгировало ингибирующее действие до 5 дней [25, 148], в случае гентамицина – до 3 дней [107]. Более того, разные *in vitro* исследования показали, что увеличение исходных концентраций в цементе, подавляет, но не предотвращает полностью образование микробных биопленок [79, 84, 86, 107]. Сформированная биопленка в этом случае имеет меньшую толщину по сравнению с цементом без антибиотика [209].

Релиз антибактериальных препаратов из цемента зависит от многих факторов, к которым относятся: гидрофобность, вязкость, пористость [87],

скорость смешивания компонентов цемента [172], площадь соприкосновения поверхности цемента с мягкими тканями, наличие микротрещин, образующихся в результате механических повреждений во время операции и статодинамических воздействий при эксплуатации, влажность окружающей среды, омывание и заполнение поверхностных слоев цемента циркулирующими физиологическими жидкостями [57], а также от загружаемой дозы антибиотика и размера его частиц: чем выше доза и меньше размер частиц, тем выше скорость релиза в окружающие ткани [51]. Помимо всего, комбинация антибактериальных препаратов в составе цемента тоже способно повлиять на элюционные свойства каждого из них за счет синергического эффекта либо взаимного усиления бактерицидной активности. [75, 83, 85, 170, 209]. Включение различных добавок, таких как целлюлоза [159], хлорид натрия, декстран, нанотрубки диоксида титана (TiO_2) [187] и др., в состав костного цемента также меняет пористость структуры матрицы и повышает релиз антибиотиков.

Анализ множества литературных источников [72, 73, 111, 116, 146, 164, 174, 184, 188, 190, 191, 217] показал, что какими бы методами не пытались влиять на релиз антибиотиков и не повышали порогенность ПММА достигнуть высвобождения более половины загруженного препарата достаточно сложно. Элюция импрегнированных противомикробных агентов из цемента и, следовательно, их антимикробная активность в подавляющем большинстве случаев неравномерные и неконтролируемые, вследствие неоднородного распределения препарата в составе депо-матрицы при ее изготовлении. Высвобождение высоких концентраций лекарственного агента одними участками ПММА может отрицательно повлиять на состояние остеобластов и репаративные свойства костной ткани или же стать источником реинфекции и появления устойчивых штаммов бактерий при элюции недостаточных концентраций другими его участками. К примеру, изучение резистентности микроорганизмов до и после имплантации спейсера с гентамицином у 33 пациентов с инфицированным тазобедренным суставом

выявило 29 % бактерий устойчивых к гентамицину до операции, после лечения костным цементом доля резистентных штаммов возросла до 41 % [162]. Кроме того, ввиду гидрофобности цемента, вне зависимости от того продолжается ли высвобождение антибиотиков или преждевременно прекратилось, всегда есть высокий риск адгезии микробов к поверхности имплантата [100, 143, 152, 153, 195]. Так, van Vugt выявил колонии микроорганизмов на поверхности извлеченных спейсеров у пациентов со стойкой ремиссией ППИ [209]. В других работах продемонстрирована адгезия бактерий к поверхности ПММА-бус при продолжающемся высвобождении препарата [3, 107]. Schiefer et al. обнаружили рост культуры *S. aureus* и *S. epidermidis* на ПММА-цилиндрах, насыщенных гентамицином, спустя 3 суток инокуляции [183]. Valato et al. отметили образование стафилококковых биопленок на цементных образцах с тобрамицином и гентамицином через 72 часа наблюдения и с ванкомицином - спустя 96 часов исследования [79]. Выявленные колонии *P. aeruginosa* по краю зоны ингибирования вокруг ПММА, импрегнированного одновременно тобрамицином и ванкомицином, подтверждают склонность костного цемента генерировать резистентные или медленно растущие изоляты бактерий (персистеры) [195]. Вместе с тем, изучение мазка, взятого из области зоны задержки роста *S. aureus* после 72-часового культивирования с антибиотикнасыщенной спейсерной бусой, выявило наличие жизнеспособных микроорганизмов [109].

Однако, несмотря на множество недостатков, костный цемент на основе ПММА, импрегнированный антибиотиком, по сей день является «золотым стандартом» промежуточного этапа лечения не только ППИ суставов [12, 24, 28, 50, 85, 92, 124, 144, 169, 209], но и хронического остеомиелита длинных костей. В последнем случае в образованный после санации очага дефект обычно имплантируют солитарный костный цемент, полностью соответствующий форме полости, или спейсерные бусы. В случае ППИ сустава применяются блоковидный (статический) или артикулирующий (динамический) спейсеры [27, 76]. Многие ортопеды предпочитают

артикулирующие спейсеры, поскольку они максимально сохраняют функциональность конечности и удаляются с минимальными потерями костной ткани в отличие от статических форм [49, 135, 193]. Однако анализ проведенных исследований, в том числе систематического обзора, показал отсутствие достоверных различий в функциональных результатах и частоте реинфекции (6–12 %) при той или иной форме спейсера [110, 149, 208, 211].

В целом успешный результат лечения костно-суставной инфекции при применении ПММА колеблется в интервале от 60 до 87,5 % [22, 34, 52, 53, 193], при грибковой этиологии положительный исход наблюдается в 62,6 % [142]. К примеру, эффективность применения спейсеров при лечении ППИ суставов в среднем составляет 86,7 % [24], из них в 29 % случаев требуется повторная санация и реимплантация цемента [32]. Успешность лечения костным цементом остеомиелита длинных костей достигается в 67,2 % случаев [25, 41]. Однако частота рецидивов при применении цементной матрицы по-прежнему сохраняется на высоком уровне - 6,3–38,9 % [24, 27, 31, 32, 34, 41, 200, 203].

Таким образом, несмотря на возможность изменения структуры костного цемента и гидрофильные свойства многих импрегнируемых антибиотиков, полной элюции препаратов из матрицы ПММА не наблюдается. Высвобождение только части загруженного лекарственного агента (до 10%) [135], создающего концентрации в очаге ниже МПК в течение длительного времени, способствует появлению резистентных штаммов микроорганизмов и, в силу своей гидрофобности, не препятствует их адгезии к собственной поверхности. Вдобавок высокая температура полимеризации на этапе имплантации может вызвать некроз костной и мягкотканых структур. Костный цемент – не деградируемый и биоинертный материал, а, значит, не подвергается резорбции и не замещается костью и зачастую на границе «кость-цемент» отграничивается фиброзной капсулой [136, 180], что со временем приводит к расшатыванию ПММА. Другие авторы считают, что основной причиной расшатывания или отслаивания частиц цемента служат

добавляемые в матрицу рентгеноконтрастные агенты (сульфат бария и диоксид циркония), которые индуцируют высвобождение провоспалительных цитокинов и, следовательно, остеолитическую реакцию тканей [122]. При этом сульфат бария обладает значительно более высокими остеолитическими изменениями по сравнению с диоксидом циркония, который характеризуется больше абразивными свойствами [89].

Несомненно, единственным достоинством цемента является его механическая прочность и широкая доступность, но ввиду ряда недостатков ПММА не может считаться оптимальной матрицей для локальной доставки препаратов [66].

1.6. Биodeградируемые депо-системы

В настоящее время биорезорбируемые материалы в зависимости от происхождения делят на несколько групп: природные полимеры (коллаген, хитозан, фибрин и др.), костно-пластический материал или заменители (аутотрансплантаты, деминерализованные костные аллотрансплантаты), керамические (керамика на основе трикальцийфосфата, гидроксиапатит, сульфат кальция, коралл и др.), синтетические полимеры (полилактид, полиэтиленгликоль, полигликолид, полиэтилметакрилат и др.) [141] и композиционные (сочетающие свойства материалов разных групп) [13]. Эффективность подавляющего большинства из них изучена и доказана только экспериментально, лишь некоторые представители применяются в клинической практике (аллогraftы, гидроксиапатит, сульфат кальция, биокомпозиции на основе гидроксиапатита и коллагена).

1.6.1. Природные полимеры

Коллаген используют в качестве альтернативы ПММА для доставки антибиотиков в очаг инфекции с 1980 г. Данный материал биорезорбируемый, обладает биосовместимостью, гидрофильностью и пористостью, высокой скоростью релиза антибиотиков, а также широкой доступностью и дешевизной [141]. Кроме того, продукты распада коллагена индуцируют

пролиферацию фибробластов и синтез собственного коллагена организма, тем самым стимулируя регенерацию костной ткани [13]. Релиз из коллагеновой матрицы осуществляется быстро - 94 % гентамицина, импрегнированного в коллагеновые губки, высвобождается через 1,5 часа после имплантации, ввиду чего скорость деградации играет лишь небольшую роль в скорости элюции препаратов [141]. Поскольку в большинстве случаев материал получают из кожи или сухожилий животных, основным недостатком коллагена является его высокая иммуногенность, которая провоцирует выраженное локальное воспаление в месте имплантации, что может способствовать обильной экссудации и нарушать заживление послеоперационной раны [10]. К недостаткам материала, помимо краткосрочного релиза антибиотиков и иммуногенности, относятся высокая скорость неоднородной резорбции с образованием аминокислот, обладающих тромбогенным потенциалом и активирующих коагуляционный каскад, наличие телопептидов с антигенными свойствами и низкая прочность, обусловленная небольшим количеством ковалентных сшивок [13].

Хитозан представляет собой сополимер глюкозамина и N-ацетилглюкозамина, деацетилированный из природного полимера хитина. В своей кристаллической форме материал нетоксичен, биоразлагаем и биосовместим [106], способен формироваться в различных формах, таких как пористые структуры, подходящие для врастания клеток и остеокондуктивности. Кроме того, хитозан обладает внутренней антибактериальной и фунгицидной активностью [13]. Эти свойства привели к тому, что хитозан был использован для каркасов тканевой инженерии, клеточных микрокапсул и в качестве носителя лекарств для антибиотиков [106]. Недостатками хитозана являются его плохая водорастворимость, что ограничивает его антибактериальную активность [196] и применение в качестве инъекционного гидрогеля, а также низкий уровень прочности материалов на его основе [13].

Несущие матрицы на основе коллагена и хитозана, в том числе их комбинации, в основном, эффективны в лечении раневых инфекций [7]

1.6.2. Костно-пластический материал

Безусловно, более предпочтительной для реконструкции и возможной локальной доставки антибиотиков в очаг является аутогенная костная ткань, обладающая остеокондуктивными и остеоиндуктивными свойствами. Однако её применение связано с рядом недостатков: необходимость создания донорской области для забора кости, ограниченные ресурсы донорских зон, увеличение продолжительности операции, дополнительная травматизация и длительная реабилитация пациента, юридические и этические ограничения, опасность переломов и хронических болевых синдромов в месте забора донорского материала [10, 62], а также риск развития осложнений. Помимо всего, применение костных блоков и стружки требует использования дополнительных конструкций (фиксирующие винты, армирующие мембраны) для предотвращения миграции имплантированного материала [13].

Аллотрансплантат губчатой кости (аллографт) в отличие от аутогенной доступен в неограниченном количестве [75, 214]. Преимуществами материала являются остеокондуктивность, отсутствие необходимости хирургического вмешательства по его удалению, возможность пропитки любым антибиотиком и высвобождение эффективных доз препарата на протяжении нескольких недель, которые в 100 раз превышают элюцию из ПММА. Также его привлекательность заключается в отсутствии необходимости цементирования, а в случае неудачного исхода – легко удаляется без дополнительной травматизации костной ткани [13, 216]. Несмотря на плюсы, материал аваскулярен, что сопряжено с риском адгезии бактерий и формирования ими микробных биопленок, имеет ряд специфических послеоперационных осложнений таких как: иммунный ответ, бактериальная костная инфекция, развитие вирусной инфекции (ВИЧ-инфекции, гепатита через материал зараженного, но серонегативного донора) [151, 214], злокачественных

новообразований, системных нарушений, туберкулеза [173]. Уменьшить риск осложнений помогает стерилизация материала в сухом виде гамма-облучением [214] в диапазоне 10–25 кГр [155], но при этом снижается биомеханическая прочность материала и его способность к включению в костную ткань реципиента [97, 173].

Хотя результаты кажутся многообещающими (90 % положительных исходов) [215, 216], быть уверенным в полном устранении костной инфекции невозможно, поскольку частота рецидива, несмотря на специальную технику обработки костного материала, по-прежнему остается на высоком уровне 4–12 % [75, 192]. Применение аллогraftа – «молодая» операция, требующая дальнейших отдаленных наблюдений и исследований. Сложная техника изготовления и стерилизация, дороговизна материала ограничивают применение данного материала в клинической практике [214].

1.6.3. Керамические биокomпозиты

Материалы из биокерамики благодаря свойству остеокондуктивности формируют каркас в области дефекта, в который прорастает костная ткань. Представители керамической матрицы (трикальцийфосфат (ТКФ), сульфат кальция, гидроксиапатит и кальций фосфат), несмотря на соотношение Са/Р в пределах диапазона, имеют различные характеристики. К примеру, ТКФ и сульфат кальция резорбируясь за короткий период, быстро и полностью высвобождают антимикробный препарат (45–80 % в течение первых 24 часов), но они менее прочные [141, 198]. При этом высокая скорость биодеградации вызывает проблемы в остеорепаративном процессе - костная ткань за это время не успевает формироваться, ввиду чего данные формы биокерамики непрочные. Так при имплантации ТКФ или сульфата кальция на границе быстро резорбируемого материала и медленно регенерирующей кости формируется слой фиброзной ткани, что обуславливает нарушение замещения дефекта костью и может стать причиной переломов [10]. Помимо всего продукты распада сульфата кальция слабо цитотоксичны и часто вызывают

стойкие выделения из раны, которые могут перерасти в глубокую инфекцию [141].

Гидроксиапатит (ГА), напротив, обладает более выраженными остеогенными свойствами, большей прочностью, способностью адсорбировать на своей поверхности лекарственные агенты. Насыщение и кинетику элюции лекарственного вещества можно контролировать с помощью пор меньшего диаметра в диапазоне микрометров, которые могут образовываться в керамических стенках макропористой структуры. Размеры пор влияют не только на процесс высвобождения препарата, но и на остеорепарацию [167]. Недостатком ГА является очень медленная скорость биодеградации [198], которая порой может достигать 12 лет [213, 214].

Композиции на основе ГА с ТКФ или сульфатом кальция в различных соотношениях способствуют пролонгированию сроков резорбции, и, следовательно, замещению материала полноценной костной тканью [10]. Минусами в зависимости от вида композиции являются отсутствие существенных начальных механических свойств и не способность удержаться в области дефекта при введении, миграция частиц материала с током крови в окружающие ткани, окисление во время схватывания, вызывающая воспалительную реакцию окружающих тканей, преждевременное разрушение при контакте с кровью по истечении времени схватывания (5-7 минут) и отсутствие признаков биодеградации на протяжении 8 недель [198].

Биоактивное стекло также было внедрено в качестве системы для локальной доставки лекарственных средств. Его внутренняя антибактериальная активность, биосовместимость, остеокондуктивность, биоразлагаемость и дешевизна выгодно отличают от других биодеградируемых материалов. Однако для данного материала характерна быстрая элюция препарата и всплеск высвобождения большей части препарата в первые сутки, ввиду прикрепления основной массы молекул антибиотика к поверхности материала [192]. Примерно 30–50 % импрегнированных антибиотиков высвобождаются из боратного стекла в

первый день [218], полностью в течение 4 суток [150] Покрытие материала 0,5 % хитозаном способно снизить берст-релиз и сохранить концентрацию препарата выше установленного предела в течение всего периода исследования, но высокое соотношение полимеров может ограничить элюцию лекарств до концентраций ниже МПК. Кроме того, хитозановое покрытие способно изменить биологическую активность биостекла в сторону замедления процесса отложения апатита и соответственно отрицательно повлиять на остекондуктивные свойства материала [192].

1.6.4. Синтетические полимеры

Синтетические полимеры обладают такими преимуществами, как контролируемая молекулярная структура и длительные сроки резорбции в течение нескольких недель-месяцев, что способствует замедленному и контролируемому релизу импрегнированных антибиотиков. В качестве депосистемы наиболее изучены производные полигликолевой кислоты и поли-L-молочной кислоты и поли-(ϵ -капролактон) [10]. Эти материалы в основном использовались в качестве разлагаемых штифтов, винтов, стержней и небольших пластин, пока в 1990-х годах не была обнаружена их способность высвобождать антибиотики. Сополимеры полимолочной и полигликолевой кислоты используются для доставки антибиотиков чаще всего в виде микросфер, микрокапсул, наносфер или нановолокон [141, 204]. Полигликолид относится к категории быстро деградируемых полимеров, поскольку не содержит в своей структуре гидрофобных метильных групп в отличие от полилактида. Меняя соотношение звеньев лактида и гликолида в сополимере, можно регулировать сроки биodeградации в широком диапазоне (от нескольких месяцев до нескольких лет) [1]. Однако у данных синтетических полимеров есть свои недостатки – формирование кислых продуктов в процессе резорбции материала, понижающие pH окружающей среды, которое в свою очередь неблагоприятно влияет не только на эффективность элюции антимикробных препаратов, но и на остeорегенерацию

[141]. Существенным минусом также является частичное повреждение структуры синтетических полимеров при стерилизации [10].

Высокомолекулярный поливинилпирролидон, импрегнированный амикацином и диоксидином, тоже показал высокую антимикробную и антитоксическую активность, биосовместимость и биоразлагаемость в течение 21 суток. Однако эффективность его доказана только в условиях *in vivo* на 6 кроликах и применение в клинической практике, согласно рекомендациям авторов, должно быть ограничено профилактическими целями риска развития остеомиелита [3].

Среди биodeградируемых матриц наибольший интерес ученых привлекают гидрогели, насыщенные антибиотиками, которые разработаны в качестве депо-систем для устранения многих недостатков, связанных с ПММА. Подавляющее большинство гидрогелей на различных основах (гиалуроновая кислота, целлюлоза, хитозан, синтетические полимеры и др.) изучены в экспериментальных условиях. Гидрогелевые матрицы с антибиотиком имеют более широкий спектр потенциальных хирургических применений по сравнению с костным цементом благодаря своей биорезорбируемой природе и оптимизированной кинетике высвобождения антимикробного агента, которая обеспечивает 10–100-кратное увеличение местных концентраций антибиотика. Резорбция гидрогеля устраняет характерный для ПММА риск субингибирующих концентраций антибиотиков и развития устойчивости к ним [112].

1.7. Резюме

Таким образом, для успешного лечения костно-суставной инфекции требуется комплексный подход, включающий радикальную хирургическую санацию с удалением обсемененной микроorganismами металлоконструкции, секвестрнекрэктомию с иссечением девитализированных тканей, локальную и системную антибактериальную терапию.

К сожалению, к настоящему времени отсутствуют допущенные к клиническому применению депо-матрицы и медицинские изделия, обладающие всем комплексом требуемых для идеальной транспортной системы характеристик. В частности, несущая система помимо способности к длительному контролируемому релизу антибиотика в эффективных концентрациях должна обладать высокой гидрофильностью, препятствующей формированию на своей поверхности и в костной ткани микробных биопленок; способностью к биодеградации, исключающей необходимость повторного оперативного вмешательства; механическими свойствами близкими к свойствам биологических тканей для исключения повреждения мягких тканей и болевых ощущений в области поражения; и вдобавок простой техникой изготовления и применения. Наиболее близким к требуемому комплексом свойств обладают биодеградируемые полимерные гидрогели на основе синтетических полимеров [45, 46].

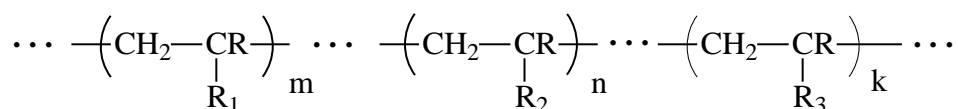
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Структура исследования включала три последовательных этапа: первый - *in vitro* изучение элюционных свойств и длительности высвобождения антибиотиков из матрицы полимерного гидрогеля; второй - *in vitro* исследование антибактериальной активности гидрогеля, импрегнированного антибактериальными препаратами, в отношении тест-культур ведущих возбудителей ортопедической инфекции; третий - *in vivo* исследование эффективности лечения экспериментально вызванного хронического остеомиелита большеберцовой кости у лабораторных животных.

В качестве группы сравнения на всех этапах исследования выбрана локальная транспортная система на основе костного цемента, поскольку данный материал является распространенным в клинической практике и наиболее изученным.

2.1. Получение ненасыщенных производных поливинилового спирта

В исследовании применен материал из ненасыщенных производных поливинилового спирта (ПВС) в виде водных растворов с концентрацией 8 г/100 мл и общей формулой:



где R - H

R₁ - OH,

R₂ - ненасыщенная группа,

R₃ - O-CO-R₄.

R₄ - CH₃ или остаток другой кислоты, из поливинилового эфира которой был получен поливиниловый спирт.

m=80-99 мол.%,

n=0,5 -15 мол.%,

k=0-12 мол.%.

Раствор ПВС был заранее приготовлен и очищен на кафедре биополимеров РХТУ им. Д.И. Менделеева проф. А.А. Артюховым и ведущим научным сотрудником Н.В. Соковой. Синтез полимеров был осуществлен согласно ранее разработанным методикам [38].

Для приготовления составных компонентов полимерного гидрогеля в качестве исходных реагентов применяли поливиниловый спирт марки VF-04 (ССР, Тайвань) со средневесовой молекулярной массой 25 000 и степенью гидролиза более 98 %.

В трехгорлую стеклянную колбу, снабженную термометром и верхнеприводной мешалкой, методом обратного холодильника заливали диметилсульфоксид (Лабтех, Россия), добавляли навеску полимера и перемешивали при нагревании до его полного растворения. После чего полученный раствор нагревали до температуры реакции 80-100 °С, добавляли к нему глицидилметакрилат (ГМА), который предварительно очищен вакуумной перегонкой ($T_b=74-75$ °С/2 мм.рт.ст.), и катализатор (серная кислота) в диметилсульфоксиде и перемешивали в течение определенного времени, поддерживая требуемую температуру. Концентрация ПВС в реакционной смеси составляла 10 мас.%, а мольное соотношение [ГМА]/[ПВС] - 1/10, моль/основание-моль. Концентрация серной кислоты во всех случаях составляла 1%.

После завершения реакции реакционную систему подвергали охлаждению. С этой целью продукт высаждали в охлажденный химически чистый ацетон. Выпавший полимер промывали в ацетоне в течение 1 часа и отделяли центрифугированием (Sigma 16P, Германия). Полученный продукт растворяли в дистиллированной воде, после чего упаривали на ротационном испарителе (Laborota 4010, Германия).

2.1.1 Получение образцов, содержащих антибиотики

2.1.1.1 Получение образцов на основе костного цемента

Для получения образцов использовали промышленно выпускаемый костный цемент на основе полиметилметакрилата (ПММА) (Сетех, Франция) и антибактериальные препараты. Исходные материалы не подвергались дополнительной обработке и очистке.

К отмеренной 5 г навеске порошкообразного полимера добавляли антибиотики в различных концентрациях, тщательно смешивали для лучшего распределения препарата в объеме матрицы. Соблюдая инструкции производителя, к навеске ПММА добавляли 2 мл жидкого мономера, тщательно перемешивали в течение 30–50 с. По достижении массой пластичного состояния шпателем переносили ее в трехкомпонентный шприц (Plastipack BD, США) объемом 20 мл, предварительно срезав конус-наконечник. После чего сформировывали образцы цилиндрической формы с высотой 20 мм и диаметром 19 мм.

2.1.1.2. Получение образцов на основе полимерного гидрогеля

Для получения образцов из полимерного гидрогеля использовались растворы акрированного поливинилового спирта с концентрацией 8 г/100 мл. Молекулярная (среднемассовая) масса полимера составляла порядка 25 кДа, степень замещения порядка 4,2 мольн.%. В качестве инициатора сшивки по свободно-радикальному механизму использовался пероксидисульфат аммония (ПСА) (Aldrich, США), в качестве ускорителя распада персульфата – соль Мора (СМ, сульфат аммония-железа (II)) (Химмед, Россия). Используемые реактивы не подвергались дополнительной очистке.

К флакону, содержащему 5 мл раствора ПВС, добавляли заранее отмеренную навеску противомикробного агента, тщательно перемешивали до полного его растворения. После чего смесь переливали в трехкомпонентный шприц (Plastipack BD, США) объемом 20 мл со срезанным конус-наконечником. Последовательно добавляли по 0,2 мл 8 % раствора СМ и 10

% раствора ПСА, каждый раз тщательно перемешивая. После приобретения материалом плотной гелевой структуры сформировывали цилиндры равные объему образцов на основе ПММА.

Так как формирование полимерных гидрогелей осуществляется в результате сшивки по свободно-радикальному механизму, то включенные в раствор лекарственные препараты на стадии его формирования, могли влиять на данный процесс посредством как передачи и обрыва кинетической и материальной цепи, так и взаимодействия с компонентами окислительно-восстановительной иницирующей системы – пероксидисульфатом аммония и солью Мора. Ввиду чего в первую очередь проводилась оценка максимально допустимого содержания препарата в растворе и концентрации инициатора, необходимой для протекания процесса сшивки в требуемом временном интервале.

2.1.3. Измерение модуля сдвига (упругости) образцов гидрогелей

Модуль сдвига полимерных гидрогелей определяли методом пенетрации сферического индентора [54, 129]. Измерение проводили следующим образом: шарик из нержавеющей стали радиусом $R = 1,9$ или $3,4$ мм, вдавливался в плоское верхнее основание образца и после релаксации (10–15 с) измерялась глубина вдавливания h (уравнение 2.1). Глубина вдавливания увеличивалась в течение нескольких первых секунд наблюдения, в последующем становилась постоянной. Данный факт свидетельствовал о достижении равновесного значения деформации и измерении именно равновесного модуля упругости. При последовательном возрастании силы воздействия шарика на гель f , находящейся в диапазоне от $0,0001$ до $0,01$ Н, определяли зависимость $h(f)$ (10–15 точек). Область деформаций h была не более $0,2R$. Наглядный вид прибора измерения модуля сдвига (упругости) образцов полимерных гидрогелей показан на рисунке 2.1.

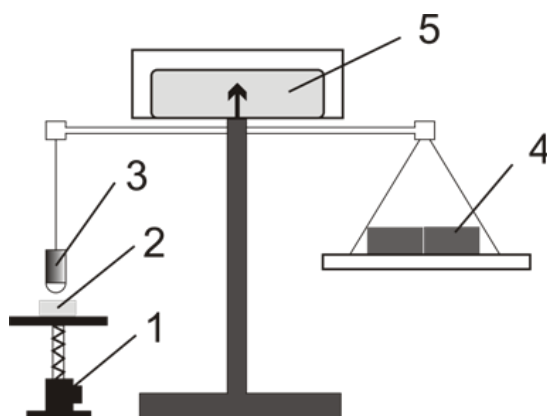


Рисунок 2.1. Принципиальная схема прибора для измерения модуля упругости геля методом пенетрации: 1 - предметный столик, 2 - образец гидрогеля, 3 - массивный цилиндр с шариком, 4 - противовесы, 5 - оптическая шкала

Анализ полученных экспериментальных значений осуществляли решением контактной задачи теории упругости [33], согласно которой, в данном случае, где гель значительно мягче, чем стальной шарик, соотношение между глубиной вдавливания шарика h и силой f должно иметь вид:

$$h = h_0 + bf^{2/3} \quad (2.1),$$

где коэффициент b зависит от модуля сдвига G и радиуса шарика R как $b = [3/(16GR^{1/2})]^{2/3}$. В соответствии с уравнением (2.1), экспериментальная зависимость h от $f^{2/3}$ хорошо описывалась, за исключением первых нескольких точек при силе f , близкой к нулю, прямыми линиями. Пример такого описания показан на рисунке 2.2.

Наклон прямой b определяли, исключая из рассмотрения начальные точки. Из данных наклона по формуле $G = 3/(16b^{3/2}R^{1/2})$ определяли модуль сдвига. Диапазон разброса в значениях модуля, определенных для нескольких образцов одного и того же образца полимерного гидрогеля, как правило, составлял в среднем $\pm 6\%$.

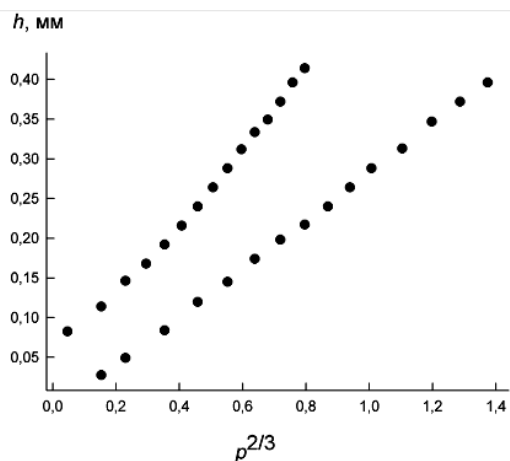


Рисунок 2.2. Пример деформационной зависимости для расчета модуля упругости гелей.

2.1.4. Изучение динамики выделения включённых биологически активных веществ из объема образцов

2.1.4.1. Построение калибровочных зависимостей концентрации антибиотиков от оптической плотности

Количественное определение биологически активных веществ в растворах осуществляли с помощью спектрофотометрического метода, позволяющего получить зависимости оптической плотности растворов от концентрации антибиотиков.

Для этого на первоначальном этапе были получены оптические спектры поглощения растворов используемых антибиотиков в фосфатном буфере (рисунок 2.3).

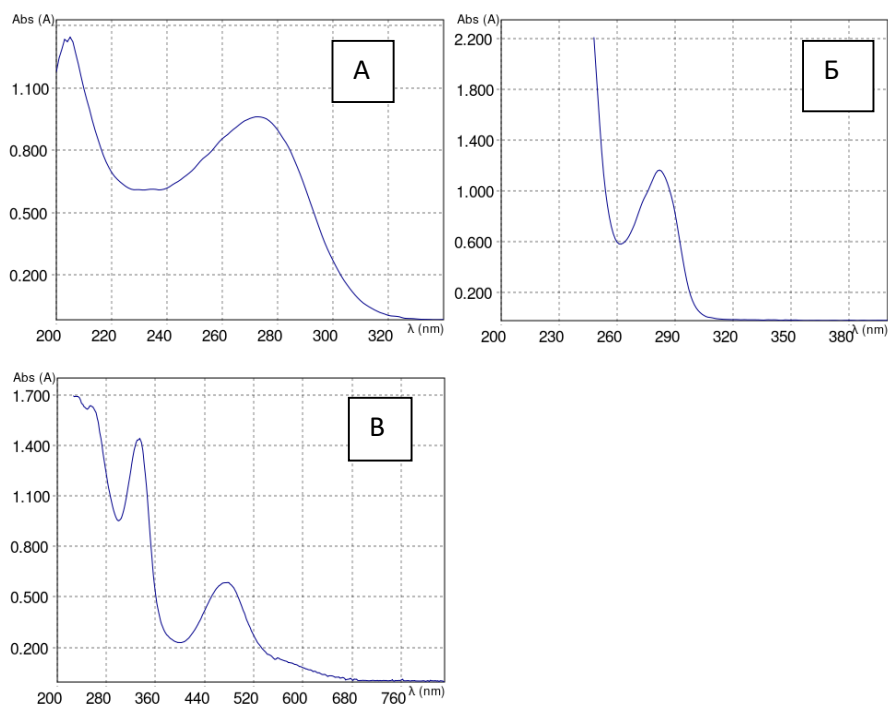


Рисунок 2.3. Спектры поглощения цефазолина (А), ванкомицина (Б) и рифампицина (В)

На основании полученных спектров были определены длины волн для измерения. Для ванкомицина, имеющего один максимум поглощения, – это длина волны, соответствующая этому максимуму. Для рифампицина и цефазолина, имеющих несколько максимумов поглощения, – длина волны, соответствующая максимуму, находящейся в видимой части спектра или средневолновой ультрафиолетовой области. Данный выбор связан со стремлением исключить возможность перекрытия сигналов поглощения изучаемого препарата и метилметакрилата (около 190 нм) либо модифицированного поливинилового спирта (около 208 нм).

Посредством измерений оптической плотности растворов соответствующих препаратов при выбранных длинах волн (272 нм для ванкомицина, 282 нм для цефазолина и 475 нм для рифампицина) были определены концентрации, при которых имело место сохранение линейной зависимости оптической плотности от концентрации (соблюдение закона Ламберта-Бугера-Бера). После чего были приготовлены калибровочные

растворы антибиотиков с концентрациями, находящимися в обнаруженном интервале (не менее 10), и определены их оптические плотности при заданной длине волны. На основании полученных экспериментальных данных, посредством их обработки с использованием средств, входящих в состав Microsoft Excel, были получены линейные зависимости вида:

$$C=aA_{\lambda}+b \quad (2.2),$$

где C - концентрация антибиотика, A_{λ} – оптическая плотность при длине волны λ , a и b – коэффициенты линейного уравнения.

Для цефазолина: $C=30,396A_{282}-0,511$;

рифампицина: $C=69,141A_{475}-5,086$;

ванкомицина: $C=184,270A_{475}-1,754$.

Для вычисления коэффициента уравнения «а» была использована функция ЛИНЕЙН (значения концентрации; значения оптической плотности; 1), коэффициента «b» - ИНДЕКС(ЛИНЕЙН (значения концентрации; значения оптической плотности; 1)).

2.1.4.2. Изучение динамики выделения импрегнированных антибактериальных препаратов из сравниваемых образцов

Динамику элюции импрегнированных лекарственных препаратов из объема образцов изучали в статических условиях. Данный процесс проводили следующим образом: образцы-цилиндры объемом порядка 5 см³, насыщенные антибиотиком, помещали в фосфатный буферный раствор и инкубировали при 37 °С. Соотношение объема образца и жидкой среды составляло 1:10. Замену физиологического раствора осуществляли через 1 час, 1, 3, 7, 14 и 28 дней соответственно. Измеряя интенсивность поглощения при характерной длине волны по предварительно построенным для каждого препарата зависимостям интенсивности поглощения от концентрации, определяли его содержание в физиологическом растворе. Выбор такого дизайна эксперимента был основан на изучении публикаций по данной тематике для возможности сопоставления наших результатов с данными других авторов [145, 171].

Помимо этого, с целью подтверждения отсутствия значимых изменений в структуре антибактериальных препаратов, способных повлиять на точность определения концентрации растворов, снимали спектры поглощения в интервале длин волн от 190 до 900 нм. В течение всего времени проведения эксперимента (28 суток) для всех образцов не наблюдалось появления дополнительных областей поглощения в полученных спектрах, что свидетельствует о стабильности вводимых препаратов в условиях эксперимента.

С целью получения достоверных данных параллельно изучались не менее 5 образцов каждого состава.

2.1.4.3. Выбор импрегнируемых антибактериальных препаратов для изучения элюционных свойств исследуемых образцов

Выбор спектра противомикробных агентов для загрузки в сравниваемые образцы материалов основывался на их различных биохимических профилях, широкой доступности и распространенности применения в клинической практике. Препаратами выбора послужили: цефазолин, ванкомицин и рифампицин. Включение рифампицина в исследование также связано с его высокой антибиопленочной активностью и частым применением в комбинации с другими группами антибиотиков при лечении костно-суставной инфекции.

2.2. In vitro исследование антимикробной активности образцов на основе полимерного гидрогеля и костного цемента, импрегнированных антибиотиками

2.2.1. Изготовление образцов из полимерного гидрогеля, насыщенных антимикробным препаратом

Образцы на основе полимерного гидрогеля изготавливали из очищенных стерильных растворов ненасыщенных производных ПВС с концентрацией 8 г/100 мл, которые были предоставлены кафедрой биополимеров РХТУ им. Д.И. Менделеева (рисунок 2.4).

Формирование образцов, импрегнированных антибактериальными препаратами, проводилось в условиях операционной отделения последствий травм опорно-двигательной системы и костно-суставной инфекции ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» МЗ РФ с соблюдением правил асептики и антисептики.



Рисунок 2.4. Составные компоненты полимерного гидрогеля (справа налево):
ПВС, СМ и ПСА.

Поскольку отверждение материала происходит в течение нескольких секунд, смешивание составных компонентов полимерного гидрогеля производили непосредственно в трехкомпонентном шприце (Plastipack BD, США) объемом 5 мл.

Отмеренную навеску лекарственного агента добавляли во флакон с 5 мл стерильного ПВС и перемешивали до полного его растворения. Затем смесь раствора переливали в трехкомпонентный шприц со срезанным конус-наконечником (рисунок 2.5, а, б). Последовательно добавляли 0,5 мл 8 % раствора СМ (рисунок 2.5, с) и 0,3 мл (в случае аминогликозидов) и 0,5 мл (в случае ванкомицина и цефазолина) пероксидисульфат аммония (рисунок 2.5, d). После каждого добавления раствор перемешивали. После окончательного отверждения материала сформировывали цилиндрические образцы размером 13x8 мм (рисунок 2.5, е, f).

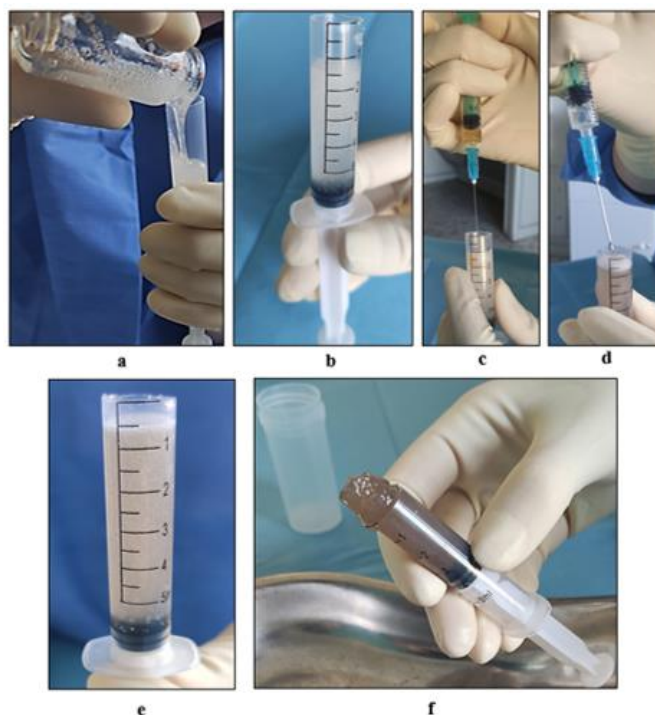


Рисунок 2.5. Этапы изготовления образцов-цилиндров из полимерного гидрогеля с ванкомицином: а – переливание раствора ПВС с антибиотиком из флакона в шприц, б – ПВС с антибиотиком в шприце, с – добавление раствора СМ, d – добавление раствора ПСА, е – сшитый полимерный гидрогель, f – формирование образцов-цилиндров

2.2.2. Изготовление образцов на основе костного цемента, насыщенных антимикробным препаратом

Для изготовления образцов из ПММА использовали промышленно выпускаемый костный цемент (Synicem 1, Франция) без содержания антимикробного агента.

Необходимую навеску антибиотика добавляли в 5 г порошкообразного полимера, тщательно перемешивали. После чего, соблюдая рекомендации производителя, к сополимеру с антибиотиком добавляли жидкий мономер в соотношении 2:1 и перемешивали вручную в течение 30-50 с (рисунок 2.6, а). Когда масса достигала пластичного состояния, стерильным шпателем производили плотное заполнение материалом объема 5 мл трехкомпонентного шприца (рисунок 2.6, б). Далее сформировывали образцы цилиндрической формы идентичные гидрогелевым (рисунок 2.6, с).

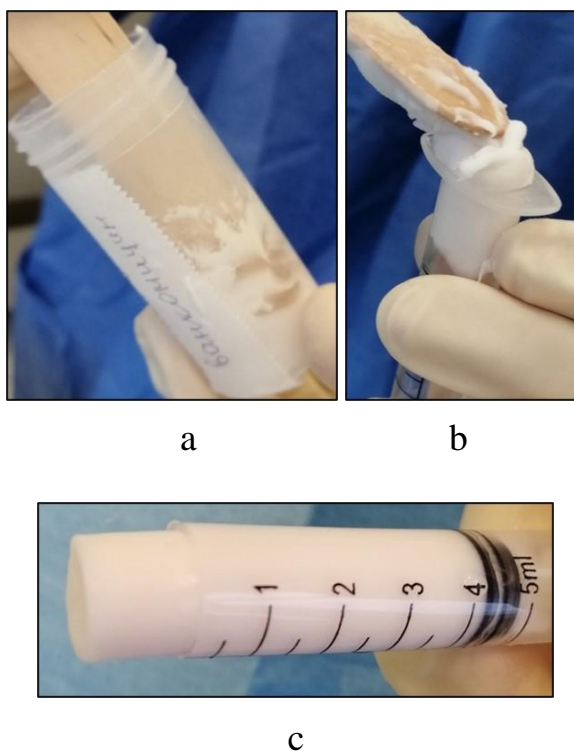


Рисунок 2.6. Этапы изготовления образцов из костного цемента, содержащих ванкомицин: а – смешивание компонентов ПММА с антибиотиком; б – заполнение объема шприца пластичной массой цемента; с – формирование образцов-цилиндров

Изготовленные образцы помещали в отдельные стерильные пробирки и направляли в лабораторию микробиологии ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» МЗ РФ. Изучение антимикробной активности сравниваемых матриц проводили в день их изготовления.

2.2.3. Выбор импрегнируемых антибактериальных препаратов для изучения антимикробной активности исследуемых матриц

Насыщение сравниваемых образцов в микробиологическом исследовании проводилось ванкомицином, цефазолином, гентамицином и тобрамицином. Выбранные препараты обладают различной молекулярной массой, физико-химическими свойствами, широко доступны и наиболее часто применяются в клинической практике в отношении ведущих возбудителей ортопедической инфекции.

Исходная загружаемая концентрация антибиотиков определялась с учетом свойств препаратов, минимальных ингибирующих концентраций, необходимых для каждой тест-культуры микроорганизмов, и результатов профилей высвобождения агентов, полученных на первом этапе исследования. Таким образом, на 5 мл полимерного гидрогеля и 5 г костного цемента исходная импрегнируемая концентрация ванкомицина составила 300 мг, цефазолина – 200 мг, гентамицина и тобрамицина – по 80 мг. Следовательно, в одном исследуемом образце объемом порядка 1,13 см³ содержалось приблизительно 67,8 мг ванкомицина, 45,2 мг – цефазолина и по 18 мг – гентамицина и тобрамицина соответственно.

2.2.4. Культивирование основных возбудителей костно-суставной инфекции

Бактерицидное действие сравниваемых образцов изучалось в отношении наиболее часто выявляемых микроорганизмов при ортопедической инфекции: *Staphylococcus aureus*, чувствительный к метициллину (*MSSA*) и устойчивый к метициллину (*MRSA*), *Staphylococcus epidermidis* метициллинчувствительный (*MSSE*) и метициллинрезистентный (*MRSE*), и представитель грамотрицательной микрофлоры – *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) [11, 65]. Были сформированы следующие пары «микроб – антибиотик»: *MSSA* – гентамицин, *MSSE* – цефазолин, *MRSA* и *MRSE* – ванкомицин, *A. baumannii* – тобрамицин. Обязательным условием включения тест-культур в исследование было наличие высокой чувствительности к выбранным противомикробным агентам.

В качестве тест-штаммов использовали культуры бактерий, идентифицированные из интраоперационных биоптатов пациентов с хроническим остеомиелитом длинных костей и перипротезной инфекцией, находившихся на стационарном лечении в отделении последствий травм опорно-двигательной системы и костно-суставной инфекции ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» МЗ РФ.

Культивирование исследуемых матриц с микроорганизмами осуществляли в соответствии с общепринятыми методами. Для родовой и видовой верификации обнаруженных бактерий и оценки их антибиотикочувствительности использовали бактериологический автоматизированный анализатор «Vitek 2 compact» (BioMerieux, Франция).

Ход исследования был идентичен диско-диффузионному методу определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Готовую микробную взвесь тест-штаммов, соответствующую стандарту мутности 0,5 МакФарланд, равномерно наносили на поверхность агара Мюллера-Хинтона в чашке Петри и подсушивали. Далее образцы на основе полимерного гидрогеля и костного цемента, насыщенные одним и тем же видом препарата, укладывали на поверхность инфицированного агара с соблюдением правил асептики. После чего чашки Петри помещали в термостат и инкубировали при 37 °С в течение 24 часов.

2.2.5. Оценка антимикробной активности сравниваемых образцов в отношении тест-культур

Эффективность антимикробной активности оценивали по наличию зоны ингибиции роста штаммов вокруг исследуемого образца. Измерение диаметра подавления микроорганизмов производили с помощью линейки-шаблона (HiMedia PW297, Индия) от края испытуемого образца до края зоны задержки роста.

Для определения длительности бактерицидного эффекта изучаемые образцы подвергались ежедневному перекладыванию в новые заранее подготовленные чашки Петри с инфицированным агаром Мюллера-Хинтона. Замер зоны подавления микроорганизмов выполняли каждые 24 часа с момента перекладывания. Данную манипуляцию повторяли на протяжении 1 недели: на 1, 2, 3, 6 (72 часа инокуляции) и 7 сутки.

С целью получения статистически значимых результатов исследование было выполнено в 3 параллельных пробах в отношении всех пар «микроб-антибиотик».

Микробиологическое исследование сравниваемых матриц выполнено в условиях лаборатории микробиологии ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» МЗ РФ (зав. лаборатории — д.м.н. Т.Я. Пхакадзе).

2.3. In vivo исследование эффективности полимерных гидрогелей

2.3.1. Общая характеристика экспериментального этапа

Экспериментальная часть работы выполнена в условиях вивария на 25 половозрелых кроликах-самцах породы Шиншилла со средней массой 2608 ± 112 г 5-6 месячного возраста. Все кролики были осмотрены ветеринаром и признаны здоровыми до включения в настоящее исследование. Кроликов после вакцинации содержали группами и давали возможность адаптироваться к окружающей среде в течение 10 дней до начала эксперимента.

Во всех случаях областью исследования была голень. Моделирование хронического остеомиелита производили в проксимальном отделе большеберцовой кости. Техника выполнения операции была одинаковой у всех кроликов. После подтверждения диагноза хронического остеомиелита все животные были разделены рандомно на 3 группы: опытная ($n=11$), сравнительная ($n=11$) и контрольная ($n=3$). Опытной группе в костномозговой канал имплантировали полимерной гидрогель, сравнительной – солитарный костный цемент, контрольной группе депо-матрицы в кость не устанавливали, но применяли системную антибиотикотерапию в послеоперационном периоде. Хирургическую санацию всем животным выполняли по одной и той же методике.

В послеоперационном периоде животных до конца исследования содержали в индивидуальных клетках в условиях вивария с 12-часовыми циклами освещения и темноты при комнатной температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$ и влажностью воздуха - 50–70 %. Для облегчения идентификации уши

животных были помечены, а клетки пронумерованы. Кормление осуществляли 3 раза в сутки согласно установленному рациону с применением комбикорма для лабораторных кроликов (Комбикорм ПК-90 для кроликов, Россия ГОСТ). В рацион кормления также были включены овощи (морковь и капуста). Корм подавали в кормовое углубление решетчатой дверцы клетки. Подача воды была постоянной. Фильтрованную водопроводную воду давали в стеклянных бутылках объемом 500 мл с стальной конической пробкой и отверстием в центре. В качестве подстила использовали опилки. Особое внимание уделяли ежедневному содержанию помещения и клеток в чистоте в целях предотвращения присоединения экзогенной инфекции. Контаминации корма, воды и подстила, способной повлиять на результаты исследования, не было.

За сутки до операции кормление кроликов прекращали, животные получали только воду. Для наркотизации животных использовали внутримышечное введение Золетила 100 (Virbac, Франция) и Медитина 0,1% (Arisenna, Россия) в дозировке 30 мг/кг и 0,5 мл/5 кг соответственно. Все манипуляции над животными проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией о гуманном обращении с животными (2000 г.).

В качестве тест-штамма для создания модели хронического остеомиелита большеберцовой кости использовали культуры *S. aureus* (MSSA). Клинические изоляты были выделены из интраоперационных биоптатов пациентов, пролеченных в отделении последствий травм опорно-двигательной системы и костно-суставной инфекции ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» МЗ РФ. Данный штамм выбран в качестве индикатора, ввиду его лидирующей позиции в этиологической структуре ортопедических инфекций [11, 14, 105, 197, 201, 207]. Кроме того, такой выбор определен на основе собственного анализа локального микробиологического мониторинга [65].

На этапе санации в качестве лекарственного агента для импрегнации в изучаемые материалы использовали цефазолин, поскольку данный препарат

ранее продемонстрировал лучшие антимикробные свойства и его применение при идентификации *MSSA* наиболее распространено в клинической практике различных лечебно-профилактических учреждений и пр. Данный антибиотик был высокоактивен в отношении выбранного штамма золотистого стафилококка.

В послеоперационном периоде как на этапе инфицирования, так и санации, область раны обрабатывали 0,05 % раствором Хлоргексидина (Росбио, Россия) до ее полного заживления. Швы снимали на 14 сутки с момента операции, при медленном заживлении - по мере ее рубцевания. Животных выводили из эксперимента на 15, 30 и 45 сутки. Эвтаназию кроликам производили под наркозом путем воздушной эмболизации через ушную вену и изымали материал для гистологического исследования. В асептических условиях отсепарировали мягкие ткани голени от большеберцовой кости, при заращении области дефекта осуществляли доступ к костномозговому каналу с целью забора материала для микробиологического исследования. После чего кость помещали в 10 % раствор формалина и направляли в патологоанатомическую лабораторию.

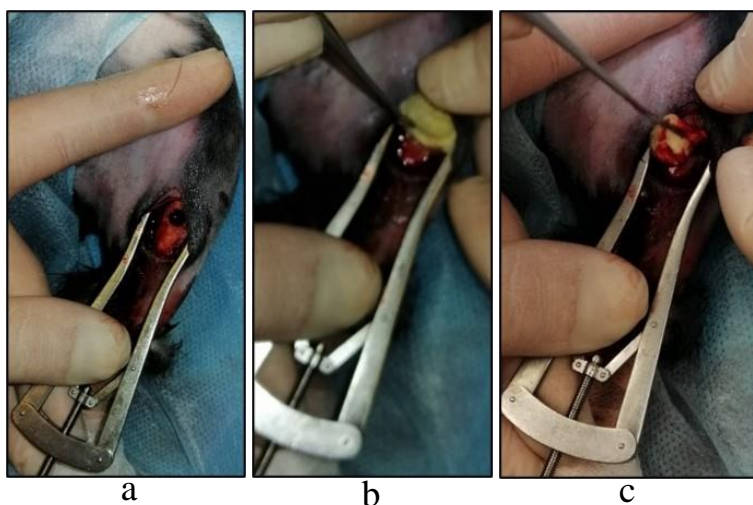
Длительность этапа инфицирования составила 21 день, этого срока достаточно для достижения хорошо зарекомендовавшей себя хронической инфекции [44, 80]. Этап санации продлился 45 дней.

Экспериментальная работа была одобрена Этическим комитетом Ученого совета ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» МЗ РФ (февраль 2019 г) и проведена согласно этическим нормам обращения с животными с соблюдением рекомендаций и требований Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006). Все манипуляции выполняли в соответствии с приказом Минздравсоцразвития РФ №708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Животные содержались в условиях, соответствующих стандартам, указанным в руководстве “The Guide for Care and Use of Laboratory Animals” (1996).

2.3.2. Техника моделирования хронического остеомиелита большеберцовой кости кролика

Моделирование хронического остеомиелита выполняли по ранее описанной методике [44].

Под общим наркозом с фиксированным положением животных на спине производили подготовку операционного поля: область выбривали и дезинфицировали повидон-йодом (Бетадин; Mundipharma AG, Швейцария). Далее после трехкратной обработки операционного поля растворами антисептиков осуществляли продольный кожный разрез длиной 1,5 см по передне-медиальной поверхности проксимального отдела голени. При помощи распатора отделяли мягкие ткани от надкостницы большеберцовой кости и фиксировали ранорасширителем. С помощью бор-аппарата «Marathon-N7» (Южная Корея) в верхней трети большеберцовой кости формировали дефект костной ткани размером 0,5x0,5 см, глубиной 4 мм с обнажением костномозгового канала (рисунок 2.7, а). В образованную костную полость устанавливали гемостатическую губку (рисунок 2.7, б, с, d), которую пропитывали 1,5 мл мутной суточной суспензии тест-культуры *MSSA* (рисунок 2.7, е) с концентрацией $1,2 \times 10^9$ КОЕ/мл, соответствующей 4 Ед МакФарланд. Операцию завершали послойным ушиванием раны (рисунок 2.7, f).



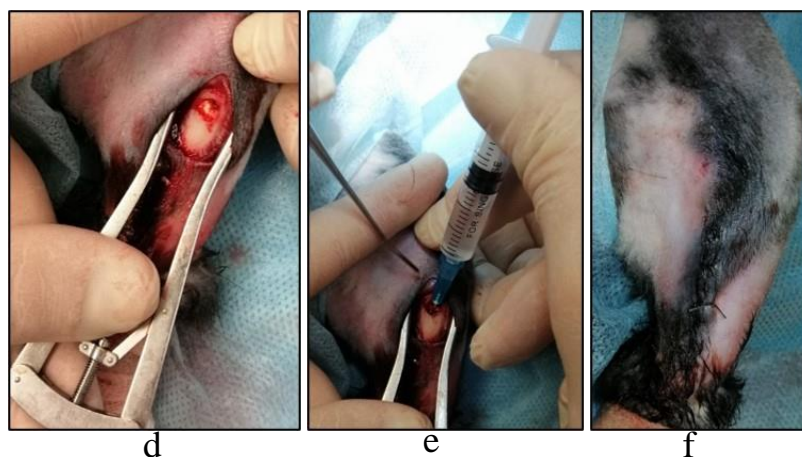


Рисунок 2.7. Этапы создания модели хронического остеомиелита большеберцовой кости у кроликов: а – дефект кортикального слоя; б, с – имплантация гемостатической губки в полость дефекта; d – гемостатическая губка, установленная в костномозговой канал; е – введение микробной взвеси; f – ушитая рана

2.3.3. Техника хирургической санации с имплантацией исследуемых матриц, импрегнированных антибактериальным препаратом

К хирургической санации большеберцовой кости приступали после подтверждения диагноза хронического остеомиелита по результатам клинического, лабораторного и рентгенологического методов исследований.

Под наркозом в фиксированном положении животных на спине производили подготовку операционного поля: сбрасывали шерсть и обрабатывали голень раствором антисептика. При наличии свища (рисунок 2.8, а) брали посев отделяемого для микробиологического исследования. После трехкратной обработки операционного поля растворами антисептиков осуществляли продольный кожный разрез длиной 3 см по ходу старого послеоперационного рубца по передне-медиальной поверхности проксимальной трети голени. При наличии гнойных затеков или карманов выполняли их вскрытие с эвакуацией содержимого (рисунок 2.8, б и рисунки 2.9, 2.10). Иссекали видоизмененные мягкие ткани (рисунок 2.11), а неизменные ткани отсепаровывали распатором и фиксировали ранорасширителем. Визуализировали область дефекта. Отверстие с помощью

фрезы расширяли в длину и в ширину до размера 0,6x0,6 см и глубиной 4 мм (рисунок 2.12, б). С целью взятия костного материала для гистологического подтверждения развития хронического остеомиелита несколько дистальнее от имевшегося дефекта мы просверливали дополнительное отверстие с такой же глубиной и размером 0,4x0,4 см (рисунок 2.12, с). Далее с помощью ложек производили санацию костномозгового канала с удалением гноя, мелких секвестров и грануляционной ткани (рисунок 2.12, а). Интраоперационные биоптаты направляли в микробиологическую лабораторию. После чего канал обильно промывали 20 мл антисептического раствора «Пронтосан» (В. Braun, Швейцария) и осуществляли гемостаз (рисунок 2.13, а).

После смены перчаток, перестилания операционного поля и дополнительной обработки растворами антисептиков приступали к этапу имплантации интраоперационно изготовленных депо-систем, импрегнированных цефазолином. Опытной группе (n=11) в костномозговой канал имплантировали до 2 мл полимерного гидрогеля, введение которого осуществляли через катетер с помощью шприца (рисунок 2.13, б, с). Сравнительной группе (n=11) устанавливали солитарный костный цемент до плотного заполнения полости канала (рисунок 2.14). В контрольной группе (n=3) имплантация материала не производилась. Операцию завершали послойным ушиванием раны.

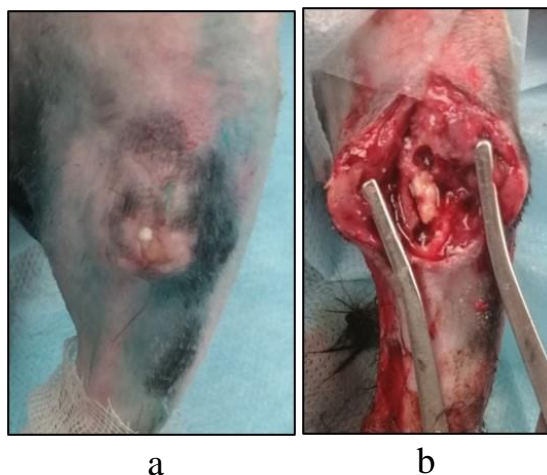


Рисунок 2.8. Первый этап санации очага инфекции: а – свищ с гнойным отделяемым в проксимальном отделе левой голени; б – удаление гноя из костномозгового канала большеберцовой кости

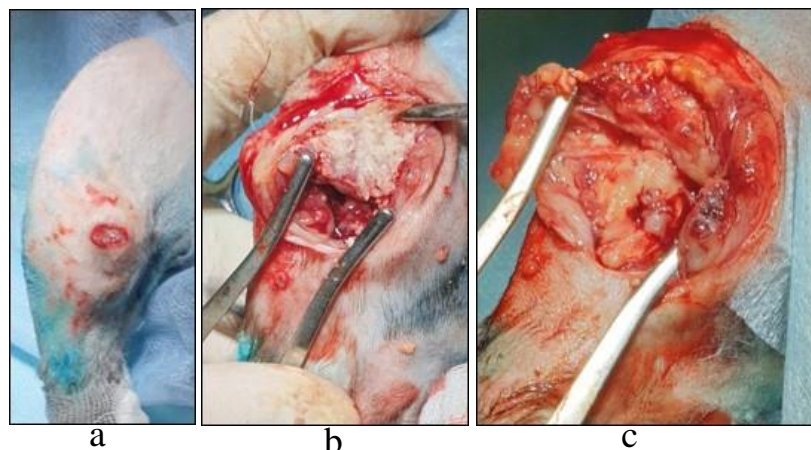


Рисунок 2.9. Первый этап санации очага инфекции: а – гнойная рана на вершине инфильтрата в верхней трети правой голени; б – вскрытие кармана с гнойным содержимым; с – удаление грануляционной ткани в проекции дефекта

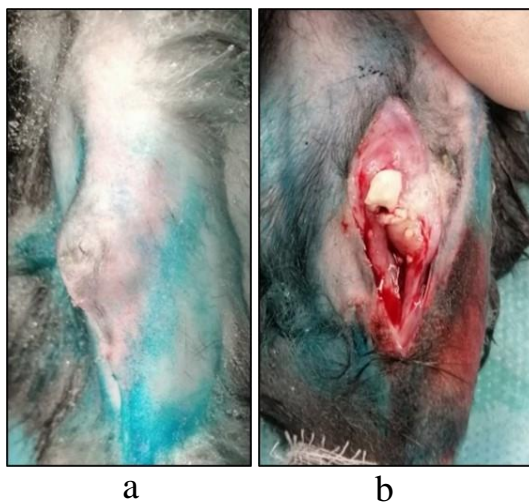


Рисунок 2.10. Первый этап санации очага инфекции: а – абсцесс в проксимальном отделе левой голени; б – вскрытие абсцесса и эвакуация гнойного содержимого

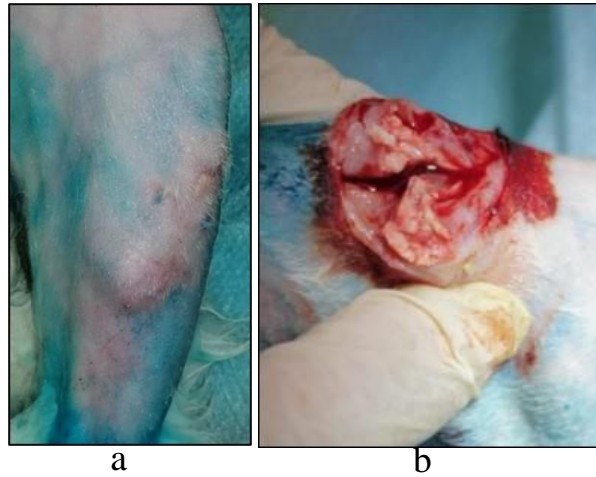


Рисунок 2.11. Первый этап санации очага инфекции: а – инфильтрат в проксимальном отделе левой голени; б – удаление инфильтрированной отечной патологической ткани

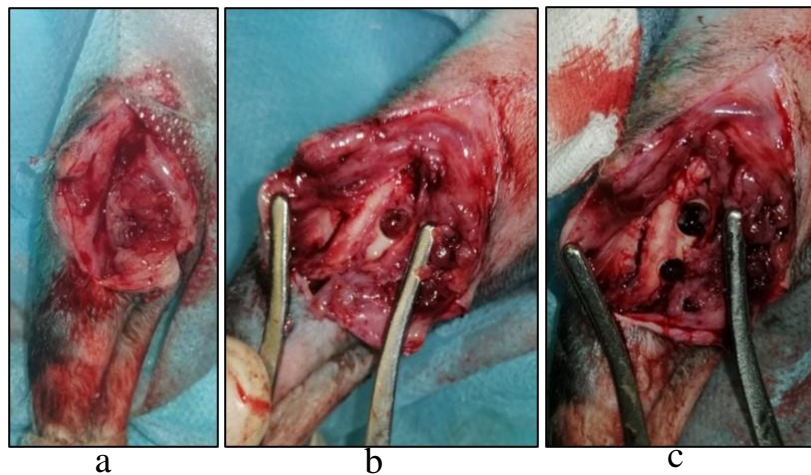


Рисунок 2.12. Первый этап санации очага инфекции: а – удаление грануляционной ткани в проекции дефекта; б – локализация дефекта; с – просверливание дополнительного отверстия

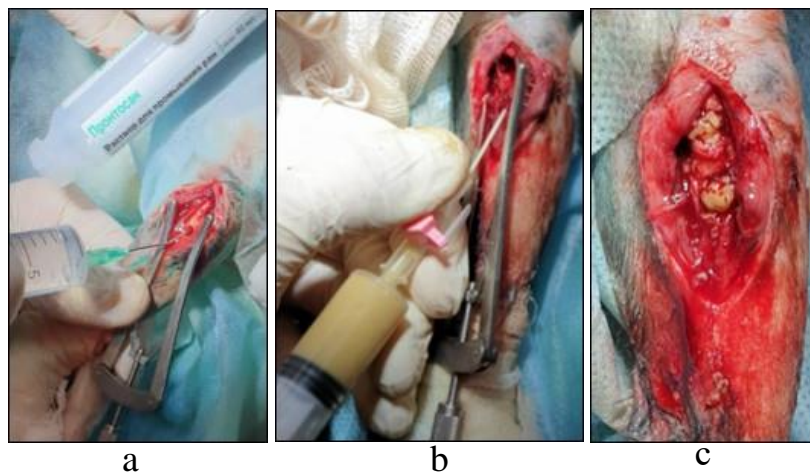


Рисунок 2.13. Второй этап санации очага инфекции: а – промывание костномозгового канала Пронтосаном; б – введение в костномозговой канал гидрогеля; с – полное заполнение канала гидрогелем



Рисунок 2.14. Имплантированный в костномозговой канал солитарный костный цемент

2.3.3.1. Интраоперационное изготовление полимерного гидрогеля и костного цемента

Во флакон с 5 мл раствора ПВС добавляли 300 мг цефазолина, смешивали до полного растворения препарата. Полученную смесь переливали в трехкомпонентный шприц объемом 5 мл (Plastipack VD, США). Далее последовательно добавляли по 135 мкл раствора соли Мора и ПСА, каждый раз взбалтывая емкость. Отвержденный материал, за счет снижения концентраций раствора соли Мора и ПСА (вместо 0,5 мл), имел более гелеобразную консистенцию (рисунок 2.15), позволяющую без технических сложностей заполнить весь объем костномозгового канала кости.

Для изготовления солитарного ПММА использовали костный цемент марки Synicem 1 (Франция), не содержащий антибиотик. В 5 г порошкообразного полимера добавляли 300 мг цефазолина, перемешивали. К полученному составу добавляли 2,5 мл жидкого мономера, тщательно смешивали вручную в течение 30-50 сек до получения пластичной массы. Имплантацию цемента в костномозговой канал осуществляли до начала реакции полимеризации.

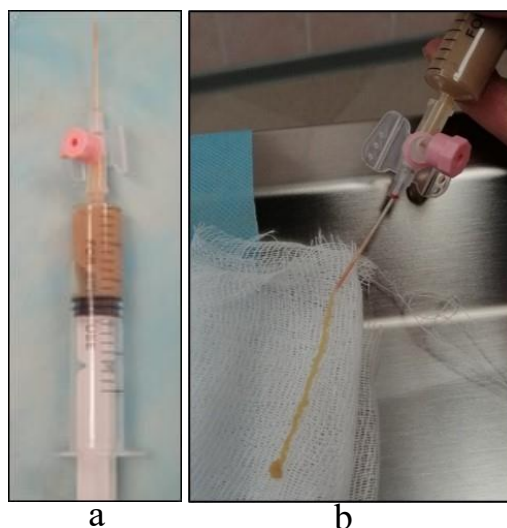


Рисунок 2.15. Интраоперационно изготовленный гидрогель с цефазолином: а – отвержденный гидрогель в шприце; б – способ заполнения костномозгового канала большеберцовой кости

2.3.4. Клинико-лабораторное исследование

Мониторинг динамики развития гнойно-воспалительных признаков в области оперативного вмешательства на этапе инфицирования и процессом заживления послеоперационной раны на этапе хирургической санации осуществляли на 1, 3, 7 сутки и в последующем с интервалом в 7 дней до 42 суток. Также в контрольные сроки фиксировали общее состояние кроликов, вес, температуру тела и осуществляли забор крови из ушной вены. В анализах крови наличие инфекционно-воспалительного процесса определяли по уровню гемоглобина (Hb) и маркеров воспаления: лейкоцитов (WBC), СОЭ и С-реактивного белка (СРБ)).

2.3.5. Лучевые методы исследования

С целью определения размеров сформированного костного дефекта, его точной локализации, формы и плотности, а также однородности костной ткани, наличия периостальной реакции и остеосклероза всем животным выполняли рентгенографию оперированной голени в двух стандартных проекциях (прямой и боковой) на 21 сутки после инфицирования и на 3, 15, 30

и 45 сутки после санации. Рентгенографию проводили на портативном рентгеновском аппарате с ручным приводом Mobile Unit - Matrix 6 В (Италия).

2.3.6. Микробиологическое исследование

Бактериальный посев осуществляли до санации очага инфекции (при наличии свища), во время и после санации (при наличии отделяемого из раны). Также после выведения животных из эксперимента микробиологическому исследованию подлежали не только мягко- и костнотканые структуры, но и полимерный гидрогель и куски костного цемента, изъятые из костномозгового канала большеберцовой кости кролика.

2.3.7. Гистологическое исследование

2.3.7.1. Парафиновая гистологическая проводка

Фрагменты тканей кроликов фиксировали 10 % нейтральным формалином в течение 72 часов, после чего промывали проточной водой и осуществляли стандартную парафиновую гистологическую проводку с использованием изопропилового спирта (Биовитрум, Россия) восходящих концентраций. Пропитывание парафином (Экстра, Биовитрум, Россия) осуществляли с трехкратной сменой реактива. Далее заливали в блоки, из которых в последующем изготавливали гистологические срезы толщиной 5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином (Биовитрум, Россия) и по Маллори (Биовитрум, Россия). Фотодокументирование осуществляли с использованием цифровой камеры микроскопа AxioLab A1 (ФРГ).

2.3.7.2. Метод костных шлифов

Фрагменты тканей кроликов фиксировали 10 % нейтральным формалином на протяжении 72 часов, после чего промывали проточной водой. Обезвоживание осуществляли изопропиловым спиртом (Биовитрум, Россия) восходящих концентраций. После чего осуществляли пропитывание полимерной смолой Technovit 9100 (ФРГ), следуя инструкции производителя. После полимеризации блоки с тканями нарезали на пластины толщиной 100

мкм на прецизионном станке Buehler Isomet 4000 (США). Полученные пластины фиксировали к предметному стеклу и шлифовали на шлифовальной машине Buehler (США) с градиентом гранул абразива от 180 до 1200 Gr. Срезы окрашивали небесным трихромом. Фотодокументирование осуществляли с использованием цифровой камеры микроскопа AxioLab A1 (ФРГ).

Изучали микропрепараты в светооптическом микроскопе AxioLab A1, (ФРГ) при увеличении от 100х до 400х.

2.3.7.3. Морфометрическая оценка гистопатологических признаков остеомиелита

Морфометрическую оценку инфекционно-воспалительного процесса на гистологических препаратах осуществляли с помощью шкалы HOES (Histopathological Osteomyelitis Evaluation Score) [199], которая включает в себя градуированную полуколичественную и аддитивную форму оценки критериев острого (от А1 до А3) и хронического остеомиелита (С1 и С2). Оценивались следующие критерии: А1 – остеонекроз, А2 – некроз мягких тканей, А3 – инфильтрат гранулоцитов, С1 – неогенез кости/фиброз и С2 – инфильтрат лимфоцитов/макрофагов. Каждый критерий в зависимости от степени выраженности оценивался балльной системой (от 0 до 3 баллов): 0 – отсутствие признаков воспаления; 1 – легкая степень выраженности; 2 – умеренная степень выраженности; 3 – тяжелая степень выраженности. При этом, собственно степень определялась количеством форменных элементов на единицу площади инфильтрата. Измерение площади осуществляли с помощью морфометрической программы MegaMorph12 (Россия).

Таким образом, если сумма баллов критериев А1-А3 составляла ≥ 4 , то гистопатологическая картина соответствовала острому остеомиелиту; сумма баллов ≥ 4 для критериев С1-С2 – хроническому остеомиелиту; при С1-С2 ≤ 4 баллов – стиханию хронического остеомиелита; при С1-С2 ≤ 1 балла – отсутствию признаков остеомиелита. Суммарный результат ≥ 6 баллов (А1-А3

и С1-С2) свидетельствовал об активном хронически выраженном остеомиелите.

Гистоморфометрическое исследование экспериментального материала выполнено д.м.н. Волковым А.В. в условиях отделения клеточных технологий и медицинской генетики ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» МЗ (зав. кафедрой — к.м.н., проф. РАЕ Ковалев А.В.).

2.3.8. Статистический анализ полученных данных

Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью программ IBM SPSS Statistics 22 и SigmaPlot 11.0. Данные параллельных *in vitro* исследований сравнительного анализа релиза антибиотиков представлены в виде медианы (Me) и 95 % доверительного интервала (95 % ДИ), антимикробной активности – в виде среднеарифметических значений. Достоверные различия бактерицидной активности между изучаемыми группами выявляли при помощи критерия Манна-Уитни. Противомикробное действие одной и той же матрицы в разные сроки исследования оценивали, используя критерий Уилкоксона. Значимыми считались значения при $p < 0,05$.

Результаты веса животных и лабораторных исследований крови для опытной и сравнительной групп кроликов в контрольные дни исследования представлены как среднее \pm стандартное отклонение ($\mu \pm Sd$). Для обнаружения межгрупповых статистически значимых различий применяли U-критерий Манна-Уитни. Достоверными считались значения при $p < 0,05$. Для контрольной группы применяли описательную статистику.

Достоверные отличия гистоморфометрических данных, имеющих ненормальное распределение по результатам теста Шапиро-Уилко, выявляли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни и критерия множественного сравнения Краскела-Уоллиса. При обнаружении межгрупповых различий по результатам теста Краскела-Уоллиса для определения достоверности групповых сравнений применяли однофакторный дисперсионный анализ с апостериорными сравнениями Тьюки. Для всех

сравнений значимым считался уровень $p < 0,05$. Статистические данные представлены как медиана и интерквартильный диапазон (Ме (25%;75%)) и изображены графически в виде диаграмм размаха.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ IN VITRO ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Результаты сравнительной характеристики элюционных свойств материалов на основе костного цемента и полимерного гидрогеля

Максимально возможные загружаемые концентрации антибактериальных препаратов, при которых получали достаточно прочные полимерные гидрогели, модуль упругости которых был близок к модулю мягких тканей, колебались в интервале от 60 до 80 мг/см³. Аналогичные результаты зафиксированы и у ПММА, где условием являлось получение отвержденного монолитного блока цемента. Полученные данные показаны в таблице 1.

Таблица 1 – Влияние концентрации импрегнируемого в композицию антибиотика на процесс формирования образцов

Антибиотик	Концентрация мг/см ³	Гидрогель	Костный цемент
		Модуль упругости, кПа	Сшивка
Ванкомицин	20	28,3±1,9	Да
	40	25,6±1,7	Да
	60	22,4±2,3	Да
	80	15,3±2,8	Да
	100	7,3±1,9	Да
Рифампицин	20	23,2±1,6	Да
	40	20,2±2,3	Да
	60	18,6±2,1	Да
	80	9,7±1,4	Нет
	100	-	Нет
Цефазолин	20	27,6±1,5	Да
	40	23,6±2,6	Да
	60	18,4±1,8	Да
	80	10,2±2,7	Да

	100	-	Нет
--	-----	---	-----

Результаты динамики элюции препаратов из костного цемента и полимерного гидрогеля представлены в виде графиков. На рисунках 3.1–3.9 продемонстрированы данные, характеризующие динамику высвобождения антибиотиков из образцов на основе ПММА. Поскольку согласно условиям эксперимента через заданные промежутки времени проводилась полная замена среды вокруг образца, в действительности, графическая зависимость изменения концентрации препарата в растворе от времени инкубации имела вид ломаной линии (рисунок 3.1, кривая «40 мг/см³»). Однако для упрощения восприятия графической информации для остальных зависимостей «нулевые» точки на график не нанесены.

При исходной импрегнации ванкомицина в костный цемент в дозировке 40, 60 и 80 мг/см³ наблюдалось резкое 5-кратное снижение концентрации высвобожденного препарата в физиологическом растворе уже на 2 сутки исследования (рисунок 3.1). На 3 сутки уровни антибиотика составили 80, 102 и 129 мг/л соответственно, на 7 сутки – 64, 85 и 107 мг/л. С 14 по 21 сутки содержание в элюате ванкомицина, высвобожденного из ПММА, сократилось в 2 раза. На 28 сутки уровни в буферном растворе при разных исходных концентрациях противомикробного агента в объеме ПММА составили в среднем 19, 22 и 31 мг/л. При этом элюировало всего 8-10 % импрегнированного в костный цемент ванкомицина за весь период исследования (рисунок 3.2). Из них 80 % агента высвободилось в первые 4-5 суток (рисунок 3.3).

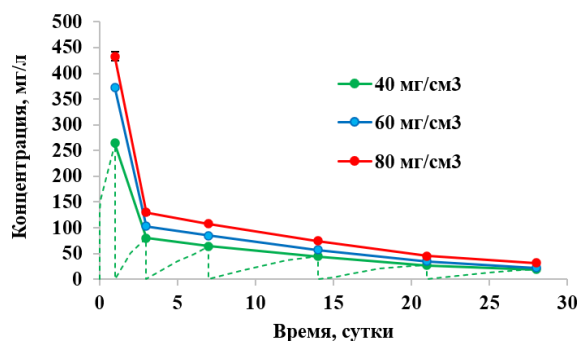


Рисунок 3.1. Костный цемент (ПММА) с ванкомицином. Зависимость изменения концентрации антибиотика (логарифмическая шкала) в растворе от времени при различной исходной концентрации препарата в образцах

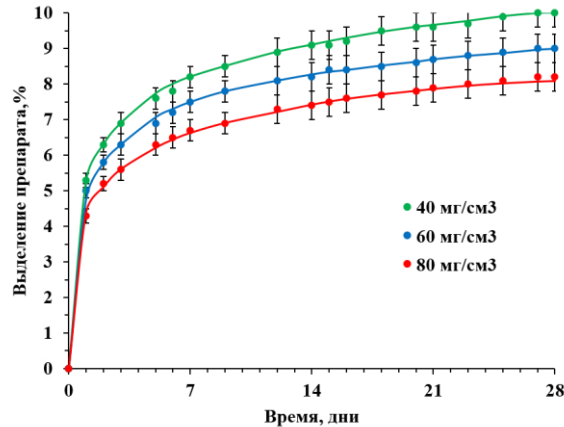


Рисунок 3.2. Костный цемент (ПММА) с ванкомицином. Зависимость доли выделившегося препарата от времени при различной исходной концентрации препарата в образцах

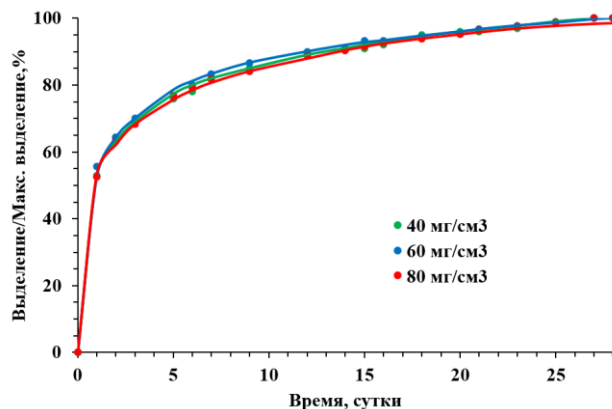


Рисунок 3.3. Костный цемент (ПММА), ванкомицин. Зависимость относительной доли выделившегося препарата от времени при различной исходной концентрации препарата в образцах

В случае рифампицина также отмечено 8- и 9-кратное снижение концентрации высвобожденного агента в элюате к 2 суткам исследования (рисунок 3.4). На 3 сутки концентрации составили 29, 43 и 67 мг/л при исходной навеске агента в ПММА 20, 40 и 60 мг/см³ соответственно. Через 2 недели наблюдения значения варьировали от 23 до 50 мг/л, через 3 недели -

18-40 мг/л. На 28 сутки исследования концентрации антибиотика в растворе в среднем составили 12,8, 19,4 и 26,7 мг/л соответственно. Всего за весь период наблюдения высвободилось до 9 % импрегнированного препарата (рисунок 3.5), из которых 80 % элюировало на 4-5 сутки (рисунок 3.6).

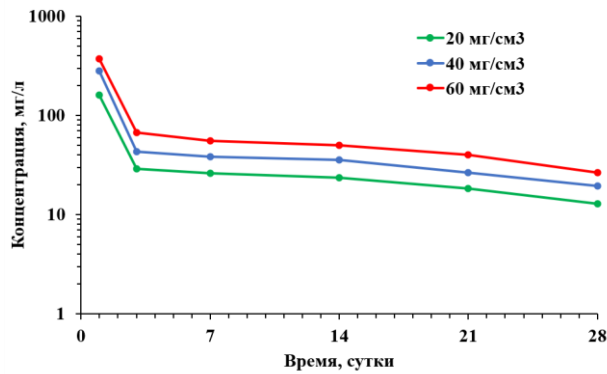


Рисунок 3.4. Костный цемент (ПММА) с рифампицином. Зависимость изменения концентрации антибиотика (логарифмическая шкала) в растворе от времени при различной исходной концентрации препарата в образцах

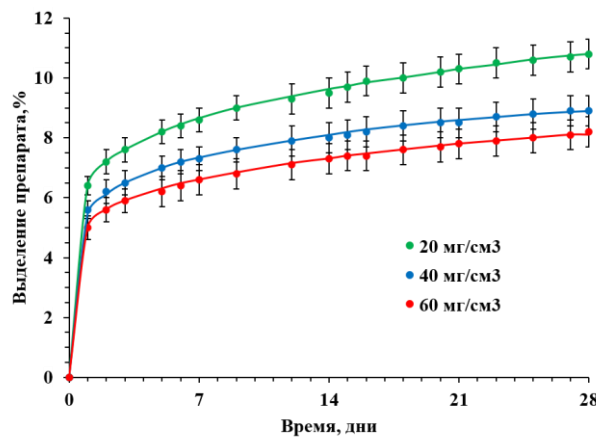


Рисунок 3.5. Костный цемент (ПММА), рифампицин. Зависимость доли выделившегося препарата от времени при различной исходной концентрации препарата в образцах

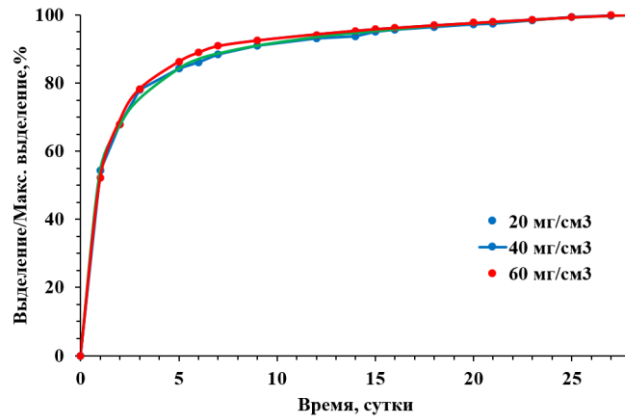


Рисунок 3.6. Костный цемент (ПММА), рифампицин. Зависимость относительной доли выделившегося препарата от времени при различной исходной концентрации препарата в образцах

Первоначальные концентрации цефазолина, высвобожденного в буферный раствор из цемента, были несколько ниже по сравнению с рифампицином и ванкомицином. Однако, как и в случае двух последних противомикробных агентов, спустя 48 часов исследования, наблюдалось 7-кратное снижение содержания препарата в элюате, вне зависимости от его исходной навески в образце (рисунок 3.7). На 3 сутки уровни агента составили 29, 52 и 71 мг/л, соответствующие импрегнациям 20, 40 и 60 мг/см³. Через 1 неделю в элюате цефазолин определялся в концентрациях 26, 46 и 61 мг/л соответственно. На 14 сутки исследования уровень высвобожденного антибиотика в растворе снизился в 1,5 раза по сравнению с 7 сутками, на 21 сутки – в 1,8 раза. В последний день исследования концентрации цефазолина колебались в среднем в диапазоне 7,5–17,6 мг/л. Всего за весь период исследования высвободилось до 8 % загруженного препарата (рисунок 3.8), из которых 80 % элюировало в первые 4-5 суток исследования (рисунок 3.9).

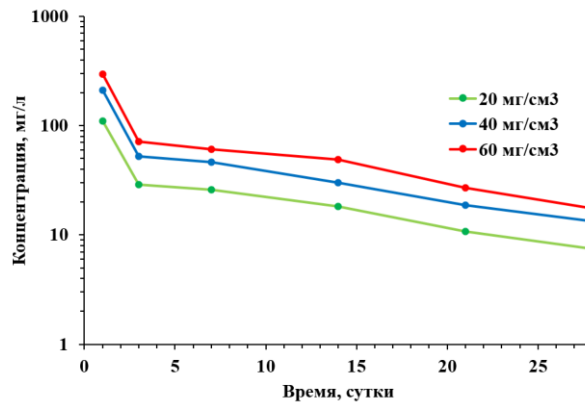


Рисунок 3.7. Костный цемент (ПММА), цефазолин. Зависимость изменения концентрации антибиотика (логарифмическая шкала) в растворе от времени при различной исходной концентрации препарата в образцах

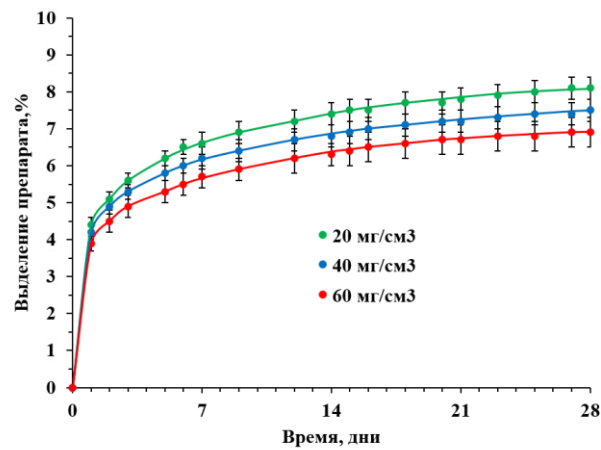


Рисунок 3.8. Костный цемент (ПММА), цефазолин. Зависимость доли выделившегося препарата от времени при различной исходной концентрации препарата в образцах

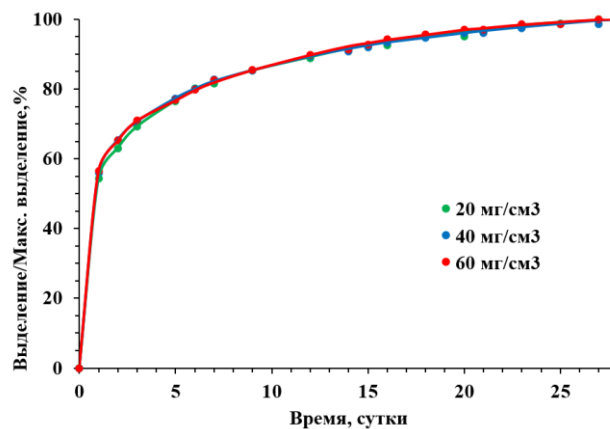


Рисунок 3.9. Костный цемент (ПММА), цефазолин. Зависимость относительной доли выделившегося препарата от времени при различной исходной концентрации препарата в образцах

В случае образцов на основе полимерного гидрогеля релиз антибиотиков протекал без резких изменений. Графическое изображение динамики высвобождения препаратов из гидрогелевой матрицы представлены на рисунках 3.10–3.19.

На 1 сутки исследования элюировало 1613 мг/л ванкомицина при его исходной концентрации в гидрогеле 40 мг/см³, 2491 мг/л – при 60 мг/см³ и 3235 мг/л – при 80 мг/см³, что в 8 раз выше релиза костного цемента (рисунок 3.10). На 2 сутки наблюдалось 2-кратное снижение концентрации препарата в растворе, при этом полученные значения в 17 раз превосходили данные ПММА. На 3 сутки уровень элюированного ванкомицина достиг 2000 мг/л, что в 15 раз выше высвобожденных цементом концентраций. На 14 сутки регистрировались значения выше МПК – 61, 101 и 132 мг/л, на 21 сутки – 42, 63 и 78 мг/мл, соответствующие исходным навескам агента в образцах 40, 60 и 80 мг/см³. К концу исследования содержание ванкомицина, высвобожденного из гидрогеля, было на уровне 32, 45 и 54 мг/л соответственно. Всего за весь период наблюдения элюировало 73 % импрегнированного в образец ванкомицина (рисунок 3.11), из них 90 % высвободилось в первые 6 суток (рисунок 3.12).

На рисунке 3.13 продемонстрирован наглядный график сравнительной характеристики уровня концентрации ванкомицина, высвобожденного из изучаемых матриц, и динамики ее изменения в течение всего периода исследования при исходной загрузке в исследуемые материалы 80 мг/см³.

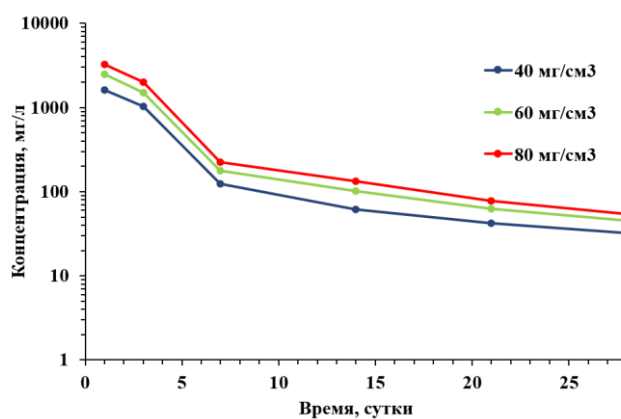


Рисунок 3.10. Полимерные гидрогели, ванкомицин. Зависимость изменения концентрации антибиотика (логарифмическая шкала) в растворе от времени при различной исходной концентрации препарата в образцах

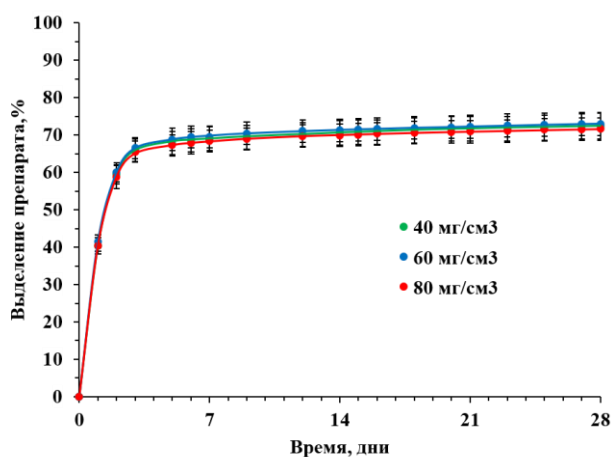


Рисунок 3.11. Полимерные гидрогели, ванкомицин. Зависимость доли выделившегося препарата от времени при различной исходной концентрации препарата в образцах

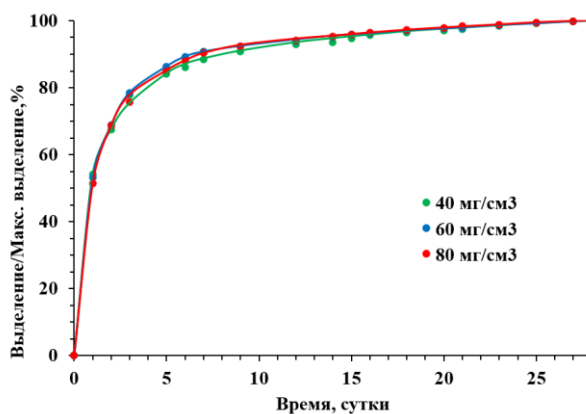


Рисунок 3.12. Полимерные гидрогели, ванкомицин. Зависимость относительной доли выделившегося препарата от времени при различной исходной концентрации препарата в образцах

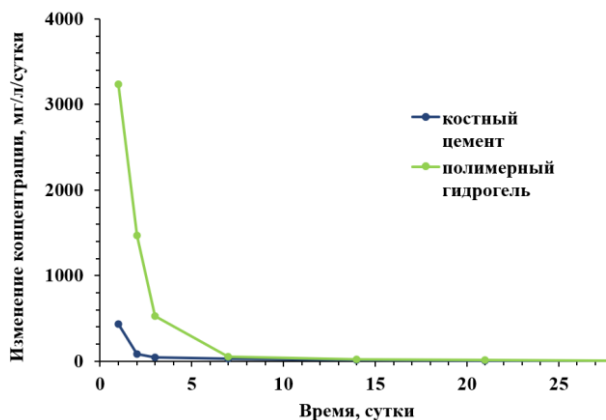


Рисунок 3.13. Зависимость изменения концентрации антибиотика в растворе от времени при различных исходных концентрациях ванкомицина в сравниваемых матрицах

Максимальная концентрация рифампицина, элюированного в раствор из полимерного гидрогеля, на 1 сутки исследования составила 2354 мг/л (рисунок 3.14). Полученные результаты в 6 раз превосходили данные ПММА-образцов на те же сутки наблюдения. На 2 сутки гидрогелевый образец высвобождал концентрации в 10-15 раз эффективнее костного цемента. На 3 сутки уровень рифампицина в элюате достиг 1090 мг/л, что в 16 раз выше по сравнению с костным цементом. К 7 суткам релиз из гидрогелевой матрицы снизился в 1,7 раза, но, несмотря на это, высвобождаемые концентрации 11-кратно превышали значения цементных образцов. В последующем и до конца исследования в растворе определяли уровни препарата в 4 раза превосходившие данные ПММА. В целом из гидрогеля высвободилось 86 % импрегнированного рифампицина (рисунок 3.15), из них 90 % элюировало в первую неделю исследования (рисунок 3.16).

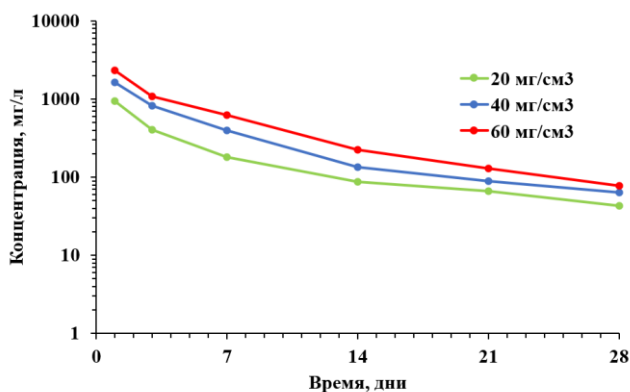


Рисунок 3.14. Полимерные гидрогели, рифампицин. Зависимость изменения концентрации антибиотика (логарифмическая шкала) в растворе от времени при различной исходной концентрации препарата в образцах

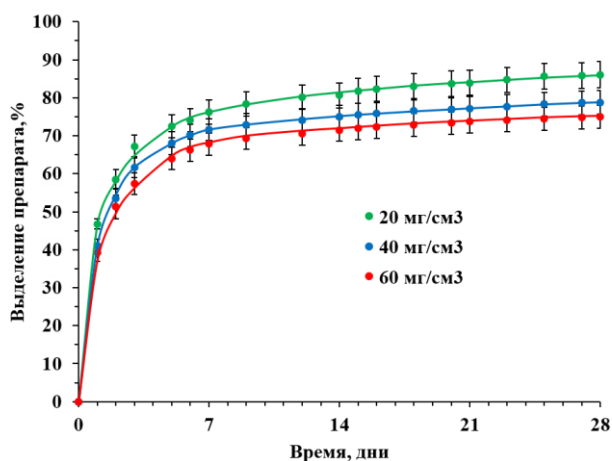


Рисунок 3.15. Полимерные гидрогели, рифампицин. Зависимость доли выделившегося препарата от времени при различной исходной концентрации препарата в образцах

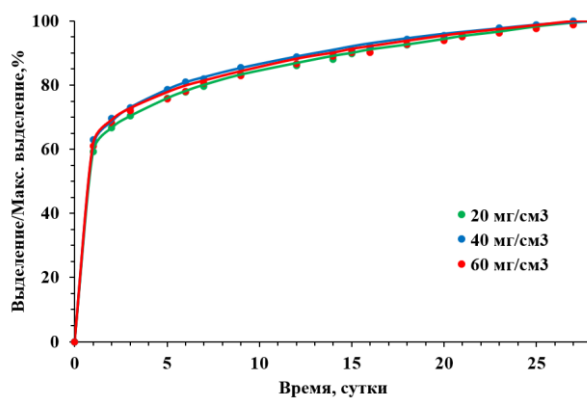


Рисунок 3.16. Полимерные гидрогели, рифампицин. Зависимость относительной доли выделившегося препарата от времени при различной исходной концентрации препарата в образцах

Релиз цефазолина из полимерного гидрогеля был практически идентичен рифампицину. При этом высвобождаемые концентрации в 8 раз превосходили ПММА на 1 сутки, в 19 раз - на 2 сутки, в 15 раз - на 3 сутки, в 11 раз - на 7 сутки и в 5 раз - в последующие контрольные дни исследования (рисунок 3.17). Общий процент высвобожденного антибиотика из гидрогелевой матрицы и его относительная доля составили 86 % и 90 % соответственно (рисунки 3.18 и 3.19).

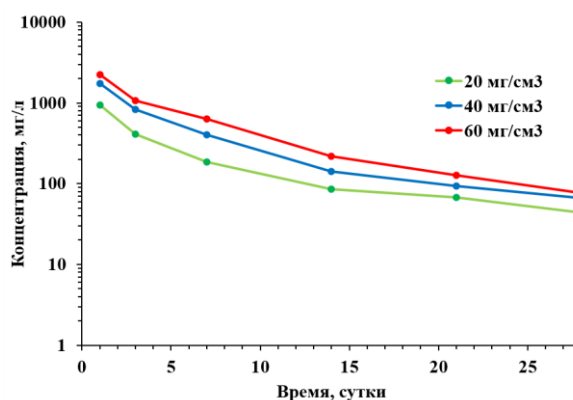


Рисунок 3.17. Полимерные гидрогели, цефазолин. Зависимость изменения концентрации антибиотика (логарифмическая шкала) в растворе от времени при различной исходной концентрации препарата в образцах

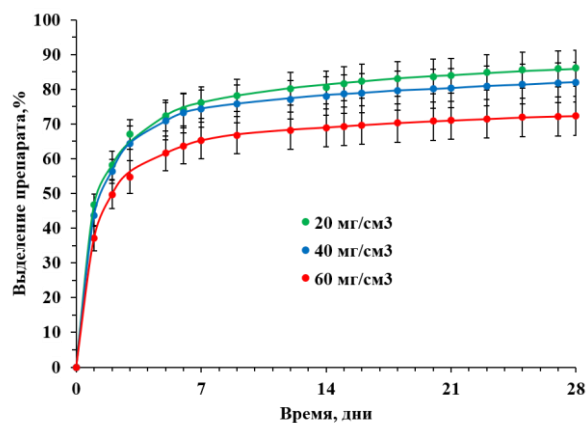


Рисунок 3.18. Полимерные гидрогели, цефазолин. Зависимость доли выделившегося препарата от времени при различной исходной концентрации препарата в образцах

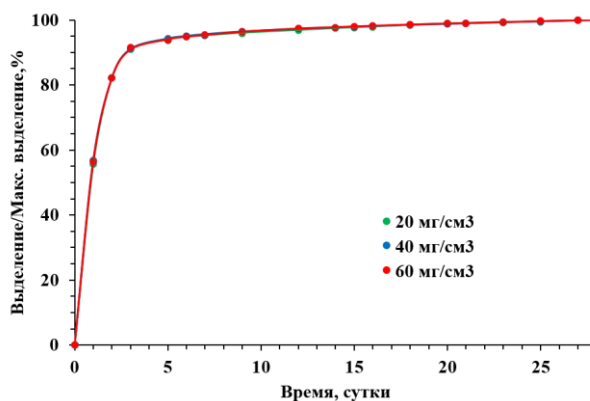


Рисунок 3.19. Полимерные гидрогели, цефазолин. Зависимость относительной доли выделившегося препарата от времени при различной исходной концентрации препарата в образцах

Полученные результаты 5 параллельных исследований для образцов костного цемента представлены в виде средних значений (Me) и 95% ДИ в таблице 2, для полимерного гидрогеля – в таблице 3.

Таблица 2 – Концентрации антибиотиков, высвобожденные из цементных образцов в контрольные дни исследования

Время, дни	Концентрация препарата, мг/л Me (95% ДИ)								
	Ванкомицин			Цефазолин			Рифампицин		
	40 мг/см ³	60 мг/см ³	80 мг/см ³	20 мг/см ³	40 мг/см ³	60 мг/см ³	20 мг/см ³	40 мг/см ³	60 мг/см ³
1	264 (255;273)	373 (361;385)	433 (414;452)	111 (106;116)	212 (202;222)	294 (276;312)	160 (158;162)	282 (265;299)	372 (342;402)
3	79,6	102,6	129,4	29	52,4	71	29	43,2	67,4

	(75,6; 83,6)	(95,2; 110)	(122,5; 136,3)	(28,5;2 9,5)	(51,8;5 3)	(66,8;7 5,2)	(28,5;2 9,5)	(40,5; 45,9)	(31,4; 103,4)
7	64,4 (63,3; 65,5)	84,6 (79,9;8 9,3)	107,6 (99,8;1 15,4)	26 (25;27)	46,2 (44;48, 4)	61 (58,9;6 3,1)	26 (24,9;2 7,1)	38,6 (36,9; 40,3)	55,4 (53,1; 57,7)
14	44,2 (42;46 ,4)	57 (53,8;6 0,2)	74,2 (68;80, 4)	18,3 (18;18, 6)	30,2 (28,6;3 1,8)	48,8 (46,8;5 0,8)	23,5 (22,3;2 4,7)	35,9 (34,3; 37,5)	50,2 (49;51 ,4)
21	27,2 (25;29 ,4)	34,6 (32,5;3 6,7)	45 (42,7;4 7,3)	10,8 (9,9;11, 7)	18,6 (17,7;1 9,5)	27,1 (26;28, 2)	18,4 (17,5;1 9,3)	26,6 (26;27 ,2)	40,4 (38,8; 42)
28	18,8 (16,6; 21)	22,4 (20,7;2 4,1)	31,6 (30,5;3 2,7)	7,5 (7,2;7,8)	13,4 (12,9;1 3,9)	17,6 (17;18, 2)	12,8 (12,3;1 3,3)	19,4 (18,8; 20)	26,7 (25,2; 28,2)

Таблица 3 – Концентрации антибиотиков, высвобожденные из гидрогелевых образцов в контрольные дни исследования

Время, дни	Концентрация препарата, мг/л.								
	Me (95% ДИ)								
	Ванкомицин			Цефазолин			Рифампицин		
	40 мг/см ³	60 мг/см ³	80 мг/см ³	20 мг/см ³	40 мг/см ³	60 мг/см ³	20 мг/см ³	40 мг/см ³	60 мг/см ³
1	1613 (1556; 1670)	2491 (2391; 2591)	3235 (3010;3 460)	933 (868;9 98)	1742 (1618; 1866)	2224 (1954; 2494)	936 (852;1 020)	1642 (1588; 1696)	2354 (2227; 2481)
3	1024 (962;1 086)	1501 (1435; 1567)	2001 (1942;2 060)	407 (388;4 26)	833 (755;9 11)	1060 (974;1 146)	408 (386;4 30)	826 (783;8 69)	1090 (1047; 1133)
7	124 (115;1 33)	176 (168;1 85)	224 (214;23 4)	184 (177;1 91)	402 (388;4 16)	634 (593;6 75)	180 (164;1 96)	395 (377;4 13)	622 (586;6 58)
14	61	101	132	86	142	218	88	135	224

	(57;65)	(97;105)	(129;135)	(80;92)	(135;149)	(204;232)	(86;90)	(130;140)	(219;229)
21	42 (40;44)	63 (57;69)	78 (75;81)	68 (64;72)	94 (91;97)	127 (122;132)	66 (64;68)	89 (86;92)	129 (126;132)
28	32 (30;34)	45 (42;48)	54 (51;57)	44 (41;47)	66 (62;70)	77 (75;79)	43 (41;45)	64 (62;66)	78 (72;84)

На примере ванкомицина на рисунке 3.20 показано соотношение скоростей элюции антибактериального агента из образцов на основе полимерного гидрогеля и ПММА при его различных исходных концентрациях в зависимости от времени суток.

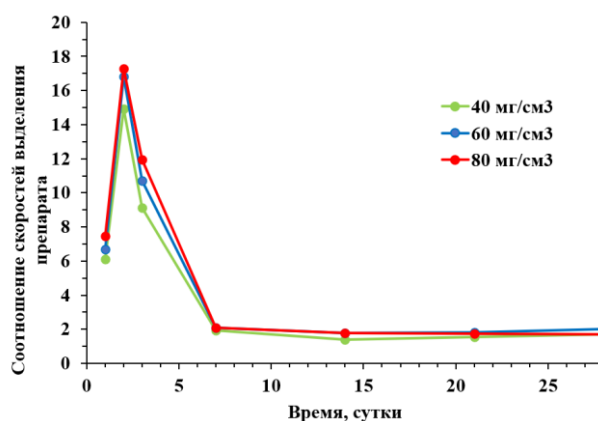


Рисунок 3.20. Ванкомицин. Зависимость соотношения скоростей выделения лекарственного препарата из гидрогеля и костного цемента от времени при различной исходной концентрации препарата в образцах

3.1.2. Резюме по результатам *in vitro* исследования элюционных свойств тестируемых образцов материалов

Таким образом, полученные результаты насыщения исследуемых матриц позволяют констатировать, что объемы антибиотиков, которые могут быть импрегнированы в оба типа материалов, в целом, сопоставимы. Несмотря на то, что в случае ПММА для рассмотренных препаратов эти значения несколько выше, статистически достоверных отличий нами не выявлено ($p > 0,05$) (таблица 1). При этом данные, полученные для цементных образцов, не противоречат результатам ряда исследований, изучавших характеристики

высвобождения антибактериальных препаратов из матрицы костных цементов [74, 118, 171]. В них сообщается, что максимально приемлемая концентрация загруженного лекарственного средства для подавляющего большинства используемых антибиотиков, как правило, составляет не более 5 % от массы ПММА-образца.

Все исследуемые нами антибактериальные препараты показали бимодальный релиз из ПММА. Как показывает таблица 2 для всех импрегнированных в костный цемент противомикробных агентов, вне зависимости от их биохимических профилей, отмечена идентичная картина, характеризующаяся достаточно низкой долей (не более 10 %) высвобождения загруженного антибиотика (рисунки 3.2, 3.5 и 3.8). По сути, релиз импрегнированного препарата осуществлялся в основном с поверхностных слоев ПММА (порядка 2-3 мм). При этом 80 % агента от этой элюированной доли высвободилось в первые несколько дней исследования (рисунки 3.3, 3.6 и 3.9). С 2 суток наблюдается резкое снижение на порядок и более скорости релиза препарата из костного цемента. В силу этого для многих использованных концентраций к 2 неделе исследования в растворе регистрируются уровни противомикробного агента ниже МПК в отношении большинства возбудителей костно-суставной инфекции (рисунки 3.1, 3.4 и 3.7).

Результаты элюционных свойств ПММА, полученные в нашем исследовании, подтверждаются данными других авторов, в том числе анализировавших релиз из ПММА-матрицы других видов антибиотиков [23, 71, 87, 117, 118, 119, 125, 137, 158, 190, 195].

Полимерные гидрогели продемонстрировали иную картину релиза включенных антибиотиков. Все образцы характеризовались высвобождением на порядок большего количества импрегнируемого препарата, составившее более 70 % (рисунки 3.11, 3.15 и 3.18). Несмотря на то, что, как и в случае ПММА, наблюдалось взрывное высвобождение, и большая доля лекарственного агента элюировала в первые 5-7 суток исследования (рисунки

3.12, 3.16 и 3.19), уровни препарата, высвобожденного в раствор, из гидрогелевых образцов были существенно выше и превышали МПК в течение всего периода исследования (таблица 3). Релиз многократно превышающих концентраций антибиотиков из полимерного гидрогеля обеспечивается активной диффузией агента со всех слоев матрицы, что, несомненно, выгодно отличает его от ПММА, имеющего минимальный потенциал элюции препарата.

Обращала на себя внимание и различная скорость высвобождения импрегнированных антибиотиков из изучаемых материалов. К примеру, для ванкомицина в случае гидрогелей скорость релиза в первые дни наблюдения была в 7, вторые – в 17, третьи – в 12, и последующие дни в 2 раза выше по сравнению с ПММА-образцами (рисунок 3.20). В случае рифампицина, полученные результаты в 6 раз превосходили данные костного цемента на 1 сутки исследования, в 10-15 раз – на 2 сутки, в 16 раз – на 3 сутки, в 11 раз – на 7 сутки и в 4 раза – в последующие дни исследования. Сходная картина наблюдалась и для цефазолина, высвобожденного из полимерного гидрогеля.

Помимо всего, у гидрогелевой матрицы в нашем исследовании наблюдалась определенная корреляция между физико-химическими свойствами препарата и динамикой его высвобождения. Как демонстрируют рисунки 3.10-3.12 и 3.17-3.19, динамика релиза цефазолина, молекула которого значительно меньше (454 Да), заметно отличается от динамики высвобождения ванкомицина (1449 Да). Причем модули упругости и частота сшивки полимерной сетки для всех тестируемых образцов различаются незначительно (таблица 1). В случае ПММА такая прямая взаимосвязь не определялась. Динамика высвобождения из костного цемента, скорее всего, определяется гранулометрическим составом используемых субстанций препаратов.

Существует мнение, что динамика высвобождения, включенных в костный цемент лекарственных агентов, положительно коррелирует с их молекулярной массой [185]. В таком случае цефазолин и рифампицин,

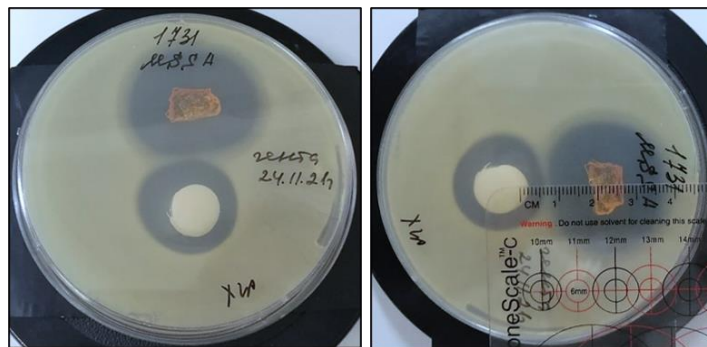
имеющие примерно $\frac{1}{3}$ молекулярного веса ванкомицина, должны более легко и быстро диффундировать из объема ПММА. Однако в нашем исследовании данное предположение не подтвердилось. Скорость элюции всех трех исследуемых антибиотиков из цементных образцов практически не отличалась. О схожих результатах сообщаются и в других исследованиях, сравнивавших элюционные свойства ванкомицина с низкомолекулярными тобрамицином и гентамицином [121, 158, 190].

3.2. Результаты микробиологического исследования антимикробной активности сравниваемых образцов

3.2.1. Антибактериальная активность препаратов в составе полимерного гидрогеля и костного цемента в отношении *S. aureus*

3.2.1.1. MSSA и антимикробная активность гентамицина, импрегнированного в полимерный гидрогель и костный цемент

На 1 сутки инкубирования исследуемых образцов с MSSA антимикробная активность полимерного гидрогеля, импрегнированного гентамицином, выше и протекает равномерно в сравнении с костным цементом (рисунок 3.21, а). Диаметр зоны подавления роста микроорганизмов вокруг гидрогеля составил 12 мм (рисунок 3.21, б), при этом ареол частичного подавления на протяжении 2 мм, окружающий основную область и переходящий в зону ингибирования вокруг костного цемента, свидетельствует об эффективном продолжающемся высвобождении препарата.



a

b

Рисунок 3.21. *MSSA – гентамицин*: а – антимикробная активность на 1-е сутки культивирования; б – диаметр зоны подавления роста вокруг полимерного гидрогеля и костного цемента

Зона задержки роста от края образца костного цемента распространилась на 5 мм (рисунок 3.21, б), что в 2 раза ниже подавляющего действия гидрогеля в отношении *MSSA*. Уже на 1 сутки исследования наблюдается неравномерная элюция гентамицина из матрицы ПММА.

На 2 сутки инкубирования антимикробная активность гидрогеля не изменилась и по-прежнему была равномерной (рисунок 3.22, а, б). У костного цемента наблюдалась несколько иная картина: бактерицидное действие снизилось, подавление было односторонним и неравномерным (рисунок 3.22, а). Очевидно, что данный факт связан с неравномерным распределением частиц антибиотика при ручном смешивании компонентов ПММА и, возможно, с релизом препарата только с поверхностных слоев. Так зона задержки роста от края цементного образца по его максимальному радиусу равна 3 мм, что в 4 раза меньше активности гидрогелевого образца на те же сутки.

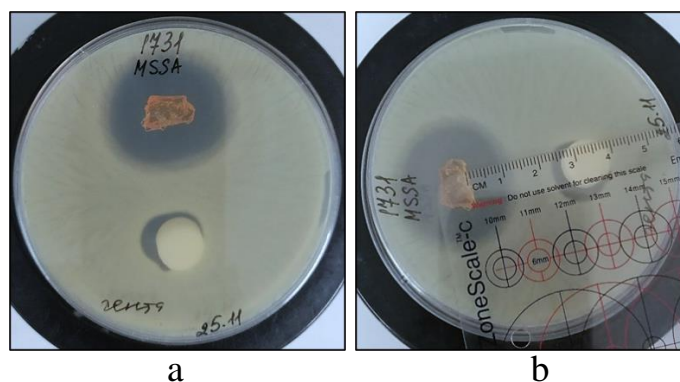


Рисунок 3.22. *MSSA – гентамицин*: а – антимикробная активность на 2-е сутки культивирования; б – диаметр зоны подавления роста вокруг полимерного гидрогеля

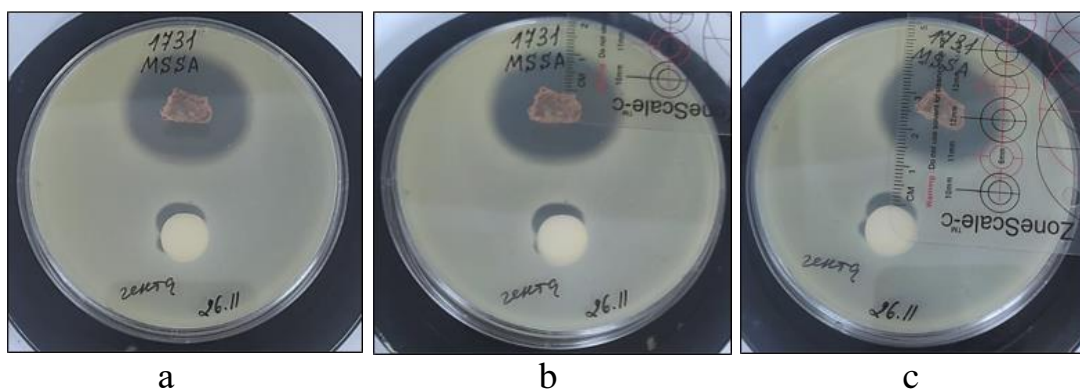


Рисунок 3.23. *MSSA* – гентамицин: а – антимикробная активность на 3-е сутки культивирования; б – диаметр зоны подавления роста вокруг полимерного гидрогеля; с – диаметр зоны подавления роста вокруг костного цемента

На 3 сутки ЗЗР *MSSA* вокруг образца на основе полимерного гидрогеля составила 10 мм (рисунок 3.23, а, б). Высвобождение гентамицина из гидрогеля по-прежнему протекало равномерно. Антимикробная активность костного цемента на 3 сутки составила 2 мм (рисунок 3.23, с), была односторонней. В этом случае существует высокая вероятность обсеменения патогенными штаммами самого костного цемента, ввиду его гидрофобных свойств.

Спустя 72 часа с момента последнего переключивания образцов и последующего культивирования, зона задержки роста вокруг полимерного гидрогеля была равна 8 мм (рисунок 3.24, б), костного цемента – 5 мм (рисунок 3.24, с). Наблюдается незначимое снижение антимикробной активности гидрогеля. Несмотря на незначительное увеличение активности цемента в отношении *MSSA*, высвобождение гентамицина по-прежнему протекало с половины поверхности образца и было односторонним (рисунок 3.24, а).

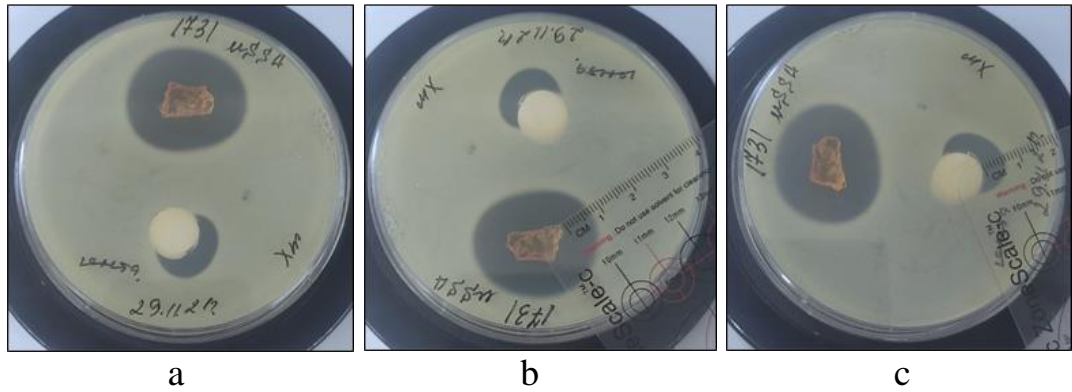


Рисунок 3.24. *MSSA* – гентамицин: а – антимикробная активность на 6-е сутки культивирования; б – диаметр зона подавления роста вокруг полимерного гидрогеля; с – диаметр зоны подавления роста вокруг костного цемента

На 7 сутки инкубации область ингибиции микроорганизма у образца на основе полимерного гидрогеля равномерная и составила 6 мм (рисунок 3.25, а, б). В случае ПММА наблюдалось полное прекращение высвобождение препарата из матрицы и, как следствие, отсутствие антимикробной активности (рисунок 3.25, а).

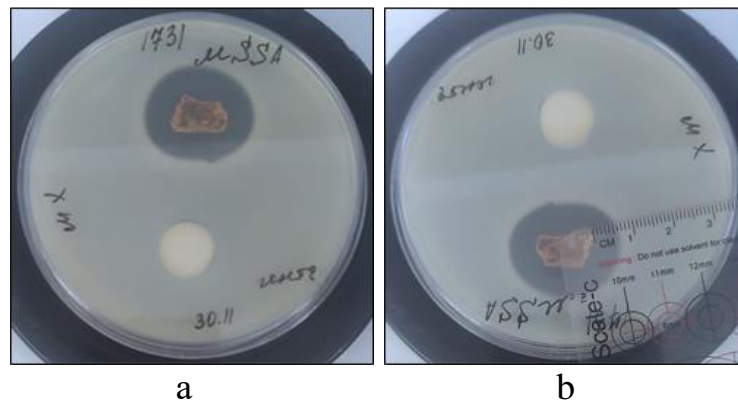


Рисунок 3.25. *MSSA* – гентамицин: а – антимикробная активность на 7-е сутки культивирования; б – диаметр зоны подавления роста вокруг полимерного гидрогеля

3.2.1.2. *MRSA* и антимикробная активность ванкомицина, импрегнированного в полимерный гидрогель и костный цемент

На 1 сутки инкубирования образцов ЗЗР в обоих случаях существенно не отличалась (рисунок 3.26, а). Так диаметр зоны подавления

микроорганизмов вокруг гидрогеля составил 7 мм, костного цемента – 6 мм (рисунок 3.26, b). Стоит отметить, что ингибирование в случае полимерного гидрогеля происходило равномерно, у костного цемента область подавления была неправильной формы. Ввиду отсутствия свойства эластичности образец на основе ПММА повредил агар при закрывании чашки Петри крышкой, на что указывают расходящиеся лучи от основания цемента. Вследствие чего замер диаметра задержки роста у цементного образца производили в области неповрежденного агара.

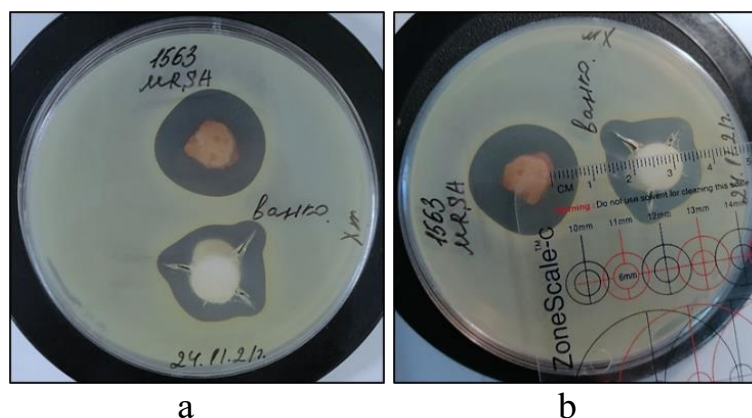


Рисунок 3.26. *MRSA* – ванкомицин: а – антимикробная активность на 1-е сутки культивирования; б – диаметр зоны подавления роста вокруг полимерного гидрогеля и костного цемента

На 2 сутки после перекладывания несущих депо-систем бактерицидный эффект полимерного гидрогеля не изменился, зона ингибирования вокруг гидрогеля была равна 7 мм (рисунок 3.27, а, б). При этом, высвобождение антибиотика протекало равномерно. Антимикробная активность костного цемента резко сократилась до 1 мм (рисунок 3.27, б). Область подавления была неравномерной, высвобождение ванкомицина из матрицы цемента происходило из $\frac{3}{4}$ ее поверхности.

На 3 сутки исследования картина противомикробной эффективности сравниваемых образцов была почти схожа с предыдущими результатами. Гидрогель продолжал равномерно высвобождать ванкомицин, при этом элюированная концентрация препарата подавила рост бактерий в пределах 7 мм (рисунок 3.28, а, б). В случае костного цемента замер по его

максимальному радиусу ингибирования показал результат в 2 мм (рисунок 3.28, b), что несколько выше по сравнению с результатом предыдущих суток. Однако подавление по-прежнему протекало неравномерно, поскольку релиз антибиотика происходил с $\frac{3}{4}$ поверхности цемента.

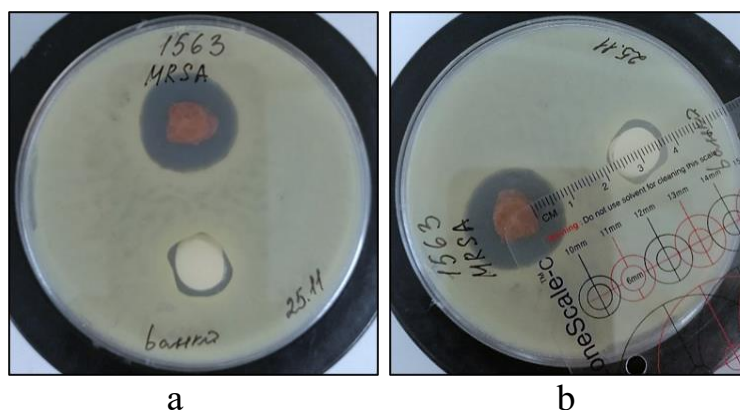


Рисунок 3.27. *MRSA* – ванкомицин: а – антимикробная активность на 2-е сутки культивирования; б – диаметр зоны подавления роста вокруг полимерного гидрогеля и костного цемента

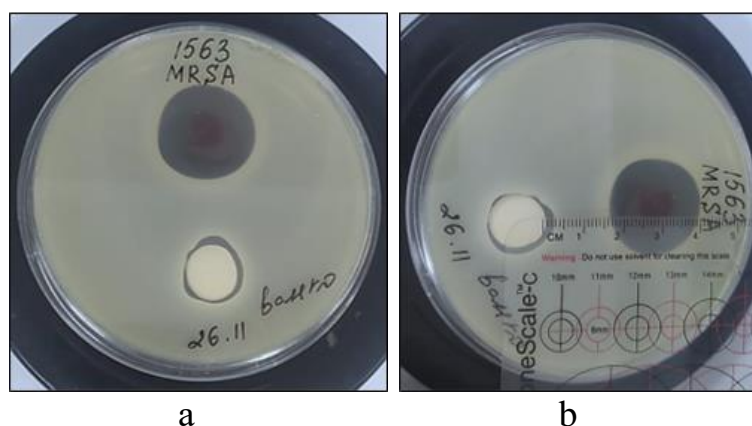


Рисунок 3.28. *MRSA* – ванкомицин: а – антимикробная активность на 3-е сутки культивирования; б – диаметр зоны подавления роста вокруг полимерного гидрогеля и костного цемента

Спустя 72 часа (на 6 сутки) культивирования полимерного гидрогеля изменений в его бактерицидной активности не наблюдалось, диаметр области подавления был таким же, что и в предыдущие дни исследования – 7 мм (рисунок 3.29, а, б). Релиз ванкомицина из гидрогелевой матрицы был равномерным. Антимикробная эффективность ПММА снизилась и составила

1 мм (рисунок 3.29, а, с). При этом высвобождение антибиотика происходило уже с $\frac{1}{2}$ его поверхности.

На 7 сутки подавление роста бактерий вокруг полимерного гидрогеля снизилось до 6 мм (рисунок 3.30, а, б). Равномерное высвобождение ванкомицина из гидрогеля к концу исследования не изменилось. Антимикробная активность костного цемента не зафиксирована, препарат к этому времени полностью прекратил свою элюцию из матрицы ПММА (рисунок 3.30, а). В таких ситуациях уже сам образец может стать источником инфекции.

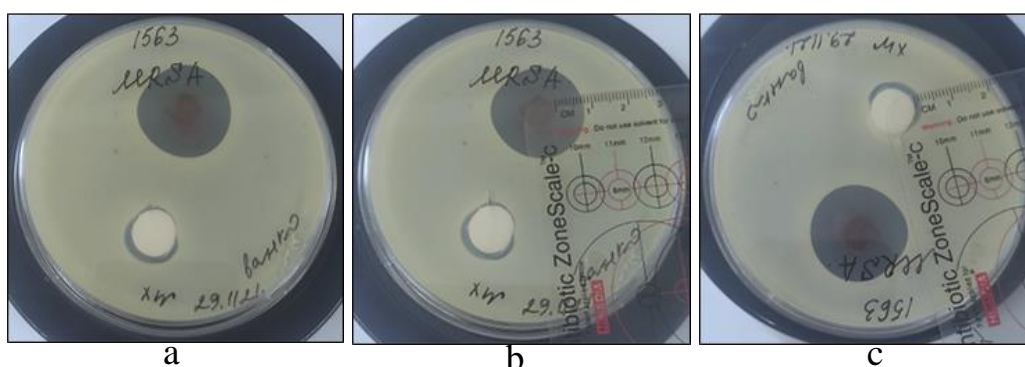


Рисунок 3.29. *MRSA* – ванкомицин: а – антимикробная активность на 6-е сутки культивирования; б – диаметр зоны подавления роста вокруг полимерного гидрогеля; с – диаметр зоны подавления роста вокруг костного цемента

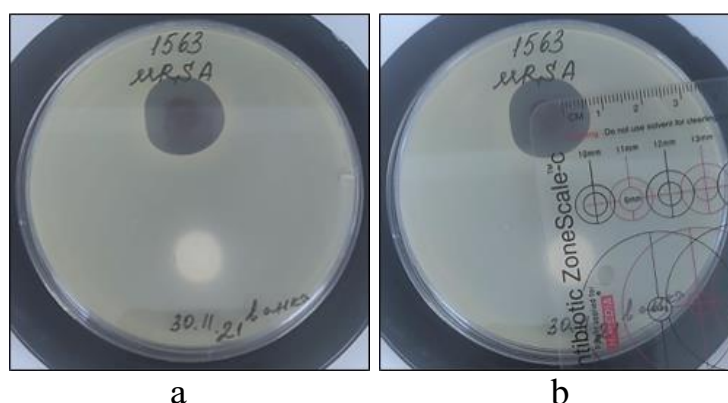


Рисунок 3.30. *MRSA* – ванкомицин: а – антимикробная активность на 7-е сутки культивирования; б – диаметр зоны подавления роста вокруг полимерного гидрогеля

3.2.2. Антибактериальная активность препаратов в составе полимерного гидрогеля и костного цемента в отношении *S. epidermidis*

3.2.2.1. *MSSE* и антимикробная активность цефазолина, импрегнированного в полимерный гидрогель и костный цемент

На 1 сутки инкубирования *MSSE* и изучаемых матриц обнаружена эффективная антимикробная активность цефазолина, высвобожденного как из полимерного гидрогеля, так и костного цемента. Зоны подавления роста микроорганизмов перекрывали друг друга, но у полимерного гидрогеля радиус ингибиции в разы больше (рисунок 3.31, а). Диаметр полного подавления штаммов для гидрогеля составил 16 мм, для костного цемента – 13 мм (рисунок 3.31, б). К тому же, ареол в 3 мм и 2 мм соответственно вокруг зоны полного ингибирования *MSSE* указывает на продолжающуюся бактерицидную активность обоих образцов.

К 2 суткам инкубирования картина антимикробной активности несколько изменилась (рисунок 3.32, а). Диаметр зоны задержки роста у полимерного гидрогеля увеличился до 20 мм, у костного цемента снизился до 10 мм (рисунок 3.32, б). Зоны подавления роста *MSSE* по-прежнему перекрывали друг друга за счет существенной бактерицидной активности цефазолина, элюированного из полимерного гидрогеля.

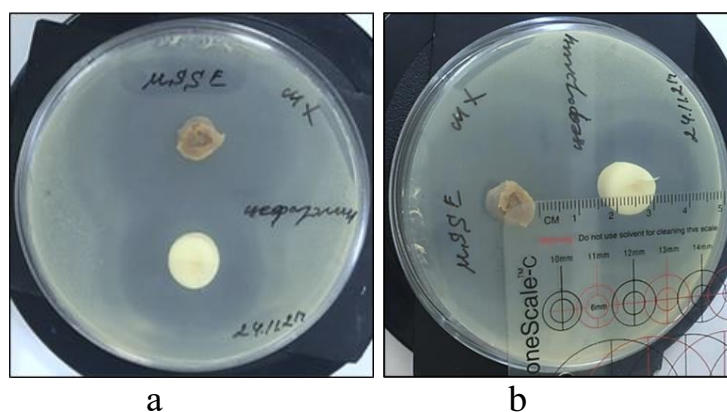


Рисунок 3.31. *MSSE* – цефазолин: а – антимикробная активность на 1-е сутки культивирования; б – диаметр зоны подавления роста вокруг исследуемых образцов

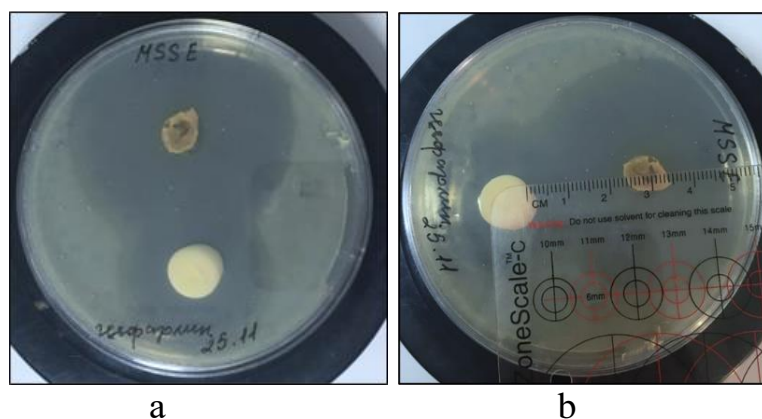


Рисунок 3.32. *MSSE – цефазолин*: а – антимикробная активность на 2-е сутки культивирования; б – диаметр зоны подавления роста вокруг исследуемых образцов

На 3 сутки область задержки роста вокруг обоих образцов несколько увеличилась (рисунок 3.33, а) по сравнению с предыдущими результатами. Так диаметр зоны ингибирования вокруг гидрогеля составил 29 мм (рисунок 3.33, б), вокруг ПММА - 19 мм (рисунок 3.33, с). Показатель гидрогеля на порядок выше результата костного цемента. Высвобождение антибиотика, учитывая округлую форму диаметров, в обоих случаях протекало равномерно.

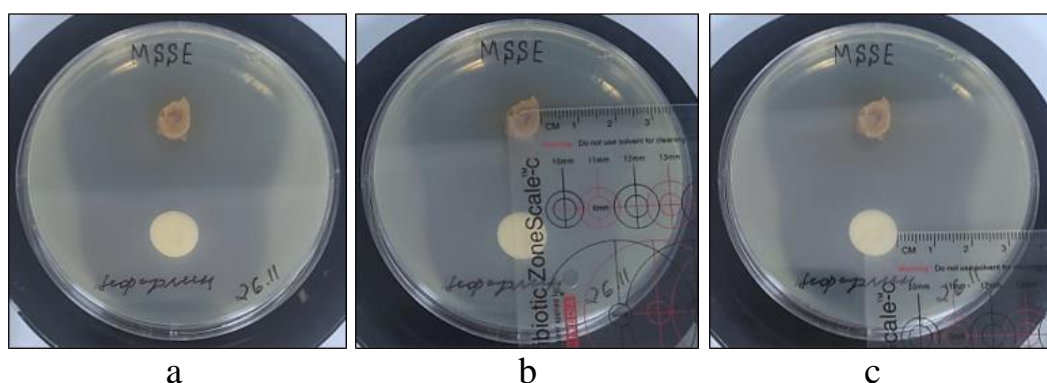


Рисунок 3.33. *MSSE – цефазолин*: а – антимикробная активность на 3-е сутки культивирования; б – диаметр зоны подавления роста вокруг полимерного гидрогеля; с – диаметр зоны подавления роста вокруг костного цемента

На 6 сутки бактерицидный эффект цефазолина, элюированного из матрицы полимерного гидрогеля, сократился до 22 мм (рисунок 3.34, а), активность костного цемента не изменилась (рисунок 3.34, б).

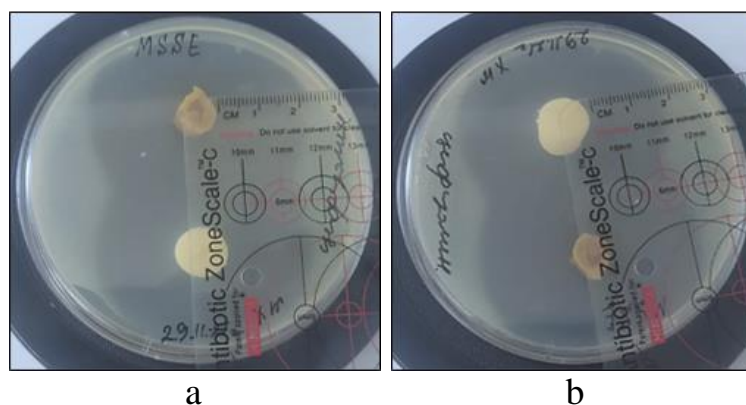


Рисунок 3.34. *MSSE* – цефазолин антимикробная активность на 6-е сутки культивирования: а – диаметр зоны подавления роста вокруг полимерного гидрогеля; б – диаметр зоны подавления роста вокруг костного цемента

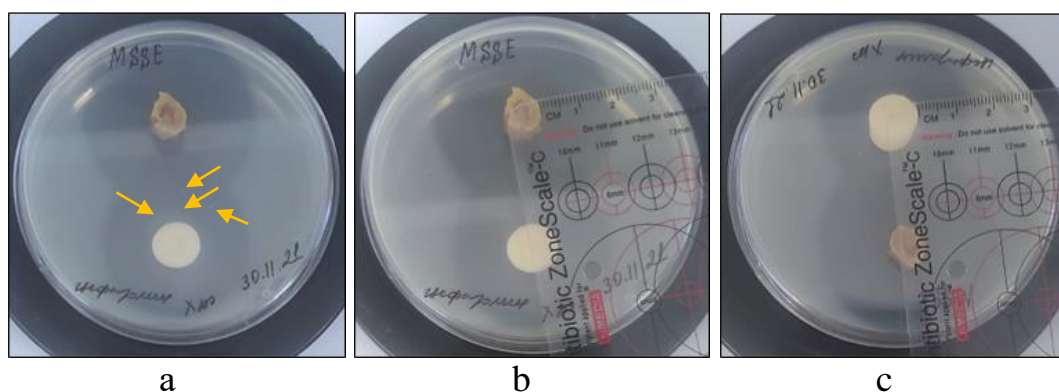


Рисунок 3.35. *MSSE* – цефазолин: а – антимикробная активность на 7-е сутки культивирования (стрелками указан колонии штаммов); б – диаметр зоны подавления роста вокруг полимерного гидрогеля; с – диаметр зоны подавления роста вокруг костного цемента

На 7 сутки культивирования бактерицидное действие гидрогеля выше в сравнении с костным цементом (рисунок 3.35, а). Если предыдущий суммарный результат за трое суток инкубирования обоих образцов существенно не различался, то на 7 сутки показатели были следующими: полимерный гидрогель – 18 мм (рисунок 3.35, б), костный цемент – 13 мм (рис. 3.35, с), что свидетельствует о лучшем противомикробном действии гидрогелевой матрицы. Стоит отметить, что, несмотря на продолжающееся высвобождение антибиотика из ПММА-образца, в его зоне подавления видны признаки начального вторичного роста *MSSE* (рисунок 3.35, а).

3.2.2.2. *MRSE* и антимикробная активность ванкомицина, импрегнированного в полимерный гидрогель и костный цемент

Ванкомицин, высвобождаемый из полимерного гидрогеля, как видно из рисунка 3.36, а, имеет больший диаметр ингибирования роста *MRSE* по сравнению с костным цементом. На 1-е сутки инкубирования зона задержки роста вокруг гидрогеля составила 9 мм, костного цемента – 5 мм (рисунок 3.36, б).

На вторые сутки исследования зона подавления роста *MRSE* ванкомицином, элюированного из полимерного гидрогеля, сохранялась неизменной – 9 мм (рисунок 3.37 а, б). Активность костного цемента резко уменьшилась до 1 мм (рисунок 3.37, б). При этом стоит отметить, что диаметр ингибирования роста вокруг гидрогеля имела правильную округлую форму за счет равномерного релиза препарата.

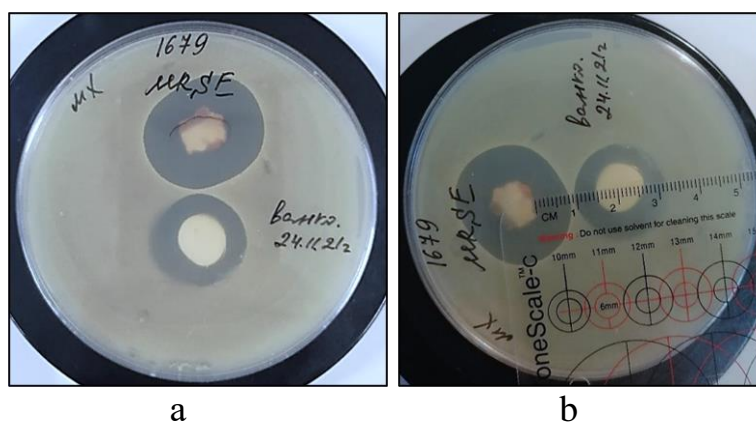


Рисунок 3.36. *MRSE* – ванкомицин: а – антимикробная активность на 1-е сутки культивирования; б – диаметр зоны подавления роста вокруг исследуемых образцов

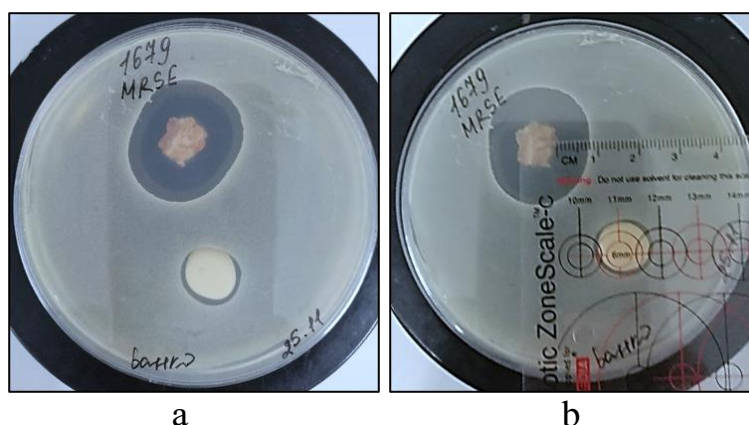


Рисунок 3.37. *MRSE* – ванкомицин: а – антимикробная активность на 2-е сутки культивирования; б – диаметр зоны подавления роста вокруг исследуемых образцов

На 3 сутки высвобождение ванкомицина из матрицы гидрогеля несколько снизилось (рисунок 3.38, а). Диаметр зоны задержки роста у гидрогелевого образца был равномерным и равен 6 мм (рисунок 3.38, б). В случае ПММА-образца элюция препарата из матрицы к 3 суткам исследования полностью прекратилась, антимикробной активности в отношении штаммов *MRSE* не наблюдалось.

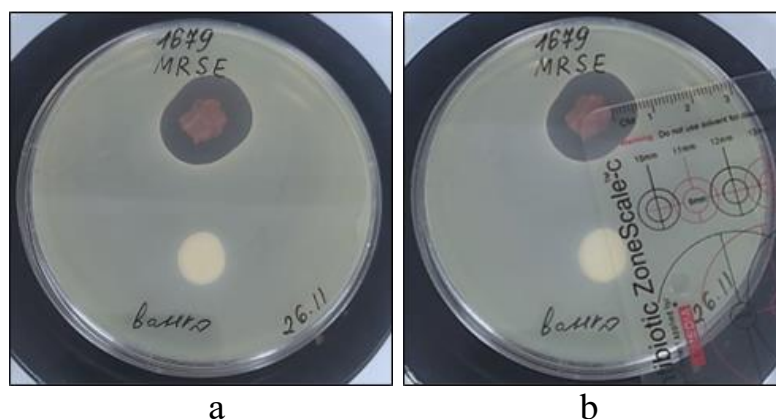


Рисунок 3.38. *MRSE* – ванкомицин: а – антимикробная активность на 3-е сутки культивирования; б – диаметр зоны подавления роста вокруг исследуемых образцов

На 6 сутки инкубирования изучаемых образцов антимикробная активность костного цемента в отношении *MRSE* по-прежнему отсутствовала (рисунок 3.39, а). В случае гидрогеля элюированный им антибиотик подавил рост штамма на протяжении 11 мм (рисунок 3.39, б).

В последний день исследования диаметр ЗЗР вокруг гидрогеля составил 5 мм (рисунок 3.40, б), а активность костного цемента отсутствовала (рисунок 3.40, а).

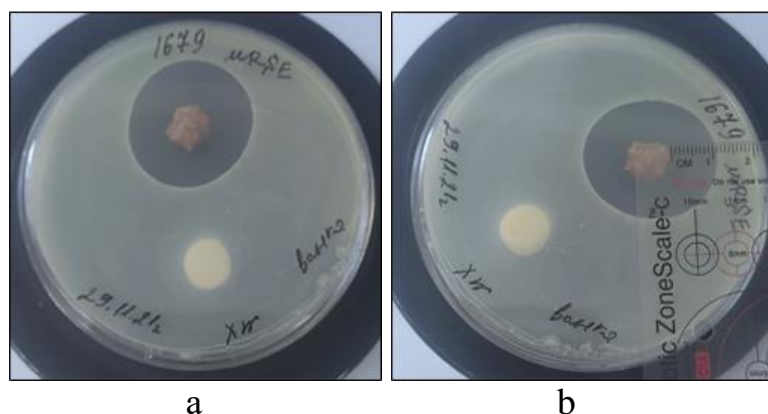


Рисунок 3.39. *MRSE* – ванкомицин: а – антимикробная активность на 6-е сутки культивирования; б – диаметр зоны подавления роста вокруг исследуемых образцов

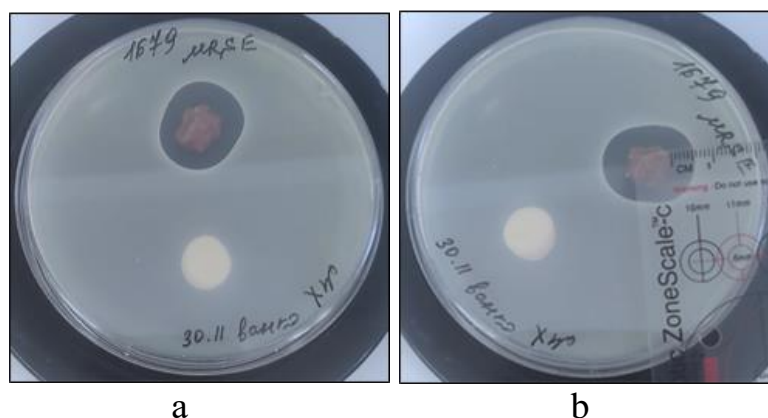


Рисунок 3.40. *MRSE* – ванкомицин: а – антимикробная активность на 7-е сутки культивирования; б – диаметр зоны подавления роста вокруг исследуемых образцов

3.2.3. Антимикробная активность сравниваемых образцов, импрегнированных тобрамицином, в отношении *A. baumannii*

На 1 и 2 сутки область ингибиции роста изолята вокруг гидрогеля был одинаков и составил 10 мм (рисунок 3.41, а, б), на 3 сутки инкубирования – 8 мм (рисунок 3.41, с). Спустя 72 часа зона подавления роста тест-культуры расширилась до 11 мм (рисунок 3.41, д), как результат 3-дневного инкубирования. В последний день наблюдения противомикробное действие сократилось до 7 мм (рисунок 3.41, е). Высвобождение антибактериального агента было равномерным в течение всего периода исследования.

<i>MSSA</i> Гентамицин	13,6	12	10	10,3	8,7	8	4,3	4,3	4,7	2,7
<i>MRSA</i> Ванкомицин	10	10,3	9	8,7	7,7	5,3	3	1,7	1,7	0,3
<i>MSSE</i> Цефазолин	27,3	27,7	29,3	25,7	23,7	22,3	12	16	15	13
<i>MRSE</i> Ванкомицин	12,7	12,3	11	12,3	9,3	6,3	3,7	1,7	1,7	0,3
<i>A. baumannii</i> Тобрамицин	13,3	11,7	11	12,3	10	8	0,3	0	0	0

Таблица 5 – Статистическое сравнение противомикробного действия полимерного гидрогеля и костного цемента с 1 по 7 сутки исследования

	1 сутки	2 сутки	3 сутки	6 сутки	7 сутки
Значимость различий (p)* (критерий Манна – Уитни)	0,002	0,000	0,001	0,001	0,001
Значимость различий (p)** диаметров зон в различные сроки для цемента (критерий Уилкоксона)	—	0,042	0,043	0,655	0,063
Значимость различий (p)** диаметров зон в различные сроки для гидрогеля (критерий Уилкоксона)	—	0,276	0,343	0,785	0,053
Диаметр зоны гидрогеля, Me (95% ДИ)	14 (11;19)	12 (10;18)	11 (9;18)	12 (10;17)	10 (8;15)
Диаметр зоны цемента, Me (95% ДИ)	8 (5;14)	3 (2;7)	2 (1;8)	1 (1;7)	0 (0;5)

* Статистическая значимость ($p < 0,05$) свидетельствует о подтверждении различий диаметров зон задержки роста микроорганизмов для полимерного гидрогеля и костного цемента в одни и те же сроки.

** Статистическая значимость ($p < 0,05$) свидетельствует о подтвержденных изменениях (сравнение с предыдущими сутками) диаметров зон задержки роста микроорганизмов отдельно для полимерного гидрогеля и костного цемента.

3.2.4. Резюме по результатам *in vitro* исследования антимикробной активности тестируемых образцов материалов

Таким образом, анализ *in vitro* исследования антимикробной активности продемонстрировал, что все образцы на основе полимерного гидрогеля, насыщенные цефазолином, гентамицином, тобрамицином и ванкомицином, имели длительное высокоэффективное ингибирующее действие в отношении тестируемых культур, которое было статистически значимым ($p=0,002$) с самых первых дней исследования по сравнению с ПММА-образцами.

Наилучшие результаты подавления отмечены у цефазолина, элюированного из обоих типов материала (рисунки 3.31-3.35). Ингибирующее действие и в том, и в другом случае было равномерным и продолжительным (более 7 суток). Своего максимального пика антимикробная активность достигла к 3 суткам наблюдения. В дальнейшем ЗЗР вокруг образцов сократилась, однако вокруг гидрогеля снижение диаметра было постепенным и контролируемым в сравнении с ПММА. Более того, эффективность полимерного гидрогеля превосходила противомикробное действие цементных образцов на протяжении всего наблюдения. В случае костного цемента, несмотря на продолжающуюся эффективную антимикробную активность и, соответственно, высвобождение цефазолина из матрицы в концентрациях выше МПК, к концу исследования в зоне подавления роста микроорганизмов вокруг него нами наблюдались множественные колонии *MSSE* (рисунок 3.35, а). Последнее указывает на приобретение тестируемыми бактериями резистентных свойств к препарату, высвобождаемому из ПММА.

Медленнее всех снижалось ингибирующее действие гидрогелевых образцов, насыщенных ванкомицином, в отношении *MRSA* и *MRSE*. ЗЗР штаммов вокруг матрицы практически не менялась на протяжении первых 3-4 суток инкубирования (рисунки 3.26-3.30 и 3.36-3.40). Такой постоянный эффект антимикробной активности ванкомицина, возможно, связан с его медленной скоростью высвобождения из полимерного гидрогеля, ввиду большой молекулярной массы частиц.

Образцы на основе костного цемента, загруженные ванкомицином, гентамицином и тобрамицином, продемонстрировали наихудшие свойства высвобождения. Диаметры зон подавления *MSSA* и *MRSA* вокруг цементных матриц, импрегнированных гентамицином и ванкомицином соответственно, были неравномерными с самого начала исследования. Релиз препаратов спустя 48 часов культивирования происходил в основном с половины поверхности цемента (рисунок 3.27), а с 3 суток наблюдения – с $\frac{1}{3}$ его поверхности (рисунок 3.23). Антимикробная активность ванкомицина в

отношении *MRSE* и тобрамицина в отношении *A. baumannii* была непродолжительной и длилась 3 дня (рисунки 3.36-3.40) и 24 часа соответственно (рисунок 3.41).

Стоит отметить, что противомикробная активность ПММА во всех парах «микроб-антибиотик» достоверно снизилась ($p=0,042$) на 2 сутки исследования, у полимерного гидрогеля такого резкого падения активности не наблюдалось ни в одном из рассматриваемых случаев ($p=0,276$) (таблица 5). К примеру, двукратное сокращение диаметра подавления микроорганизмов вокруг гидрогелевого образца, насыщенного гентамицином, отмечалось только с 7 суток культивирования. В целом, эффективность гидрогеля к 2 суткам была достоверно в 3-4 раза выше по сравнению с костным цементом, в случае тобрамицина – в 11 раз выше (таблица 4).

Эффективную антимикробную активность цефазолина, высвобожденного из ПММА-образца в нашем исследовании, можно было бы объяснить высокой скоростью релиза его низкомолекулярных и водорастворимых частиц. В таком случае, гентамицин и тобрамицин, имеющие схожую с цефазолином массу частиц (477 Да и 467 Да соответственно) и водорастворимость, должны были продемонстрировать более высокий бактерицидный эффект по сравнению с ванкомицином. Однако в нашем исследовании антибактериальная активность гентамицина, тобрамицина и ванкомицина, импрегнированных в цемент, была в равной степени низкой. Конечно, полученные результаты можно было бы обосновать более высоким исходным содержанием ванкомицина в цементных образцах (67,8 мг ванкомицина против 18 мг гентамицина или тобрамицина). Однако, в случае полимерного гидрогеля, несмотря на эту различную концентрацию препаратов в составе исследуемых матриц в нашем исследовании, скорость релиза аминогликозидных антибиотиков была выше скорости элюции ванкомицина, притом, что бактерицидная активность всех трех противомикробных агентов была в равной степени пролонгированной.

Таким образом, результаты микробиологического исследования еще раз подтвердили присутствие определенной положительной взаимосвязи между биохимическим профилем импрегнированного в гидрогель препарата и динамикой его десорбции, и отсутствие этой корреляции у костного цемента.

Принимая во внимание форму диаметров зоны ингибиции тестируемых микроорганизмов вокруг образцов на основе полимерного гидрогеля, исходную навеску антибиотиков, включенных в состав матрицы, постепенное сокращение антимикробного эффекта и значения, зафиксированные к концу исследования ($M_e=10$ мм, 95 % ДИ - 8;15), можно заключить о достоверном высокоэффективном пролонгированном противомикробном действии гидрогеля за счет равномерного распределения частиц антибиотиков в его структуре и их контролируемом высвобождении.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ IN VIVO ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Модель хронического остеомиелита большеберцовой кости кроликов

К 21 суткам инфицирования у 60 % кроликов (n=15) в области послеоперационного рубца голени развился свищ с гнойным отделяемым (рисунок 4.1, а), у 12 % (n=3) сформировался абсцесс (рисунок 4.1, б), у 16 % (n=4) - рана с густым гнойным отделяемым (рисунок 4.2, а, б). В остальных 3 (12 %) случаях остеомиелит большеберцовой кости клинически проявился только гиперемией и гипертермией кожных покровов оперированной голени (рисунок 4.2, с).

У 44 % животных (n=11) вышеперечисленные симптомы сопровождались повышением температуры тела, которая к концу этапа инфицирования в среднем составила $41,7 \pm 0,9$ °С.

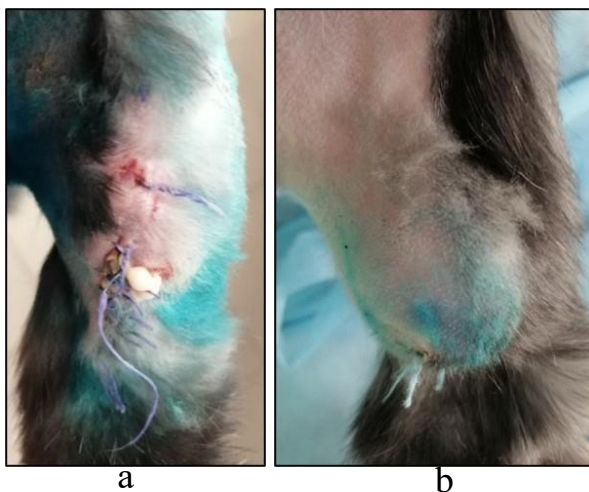


Рисунок 4.1. Локальный статус оперированной конечности у кроликов на 21 сутки инфицирования: а – свищ с гнойным отделяемым; б – абсцесс

Во всех случаях наблюдалось снижение активности животных, подавляющее большинство из них занимало вынужденное, сгибающее конечность, положение, что привело к развитию гипотрофии мышц бедра и голени. Хромота на оперированную конечность при ходьбе отмечена у 22 (88 %) кроликов, снижение аппетита - у всех исследуемых животных. Вес кроликов за 21 день в среднем снизился на 564 ± 113 г.

В анализах крови наблюдался сдвиг уровней маркеров воспаления в сторону увеличения. Данные результатов лабораторных показателей крови для каждой группы представлены в таблице 6.

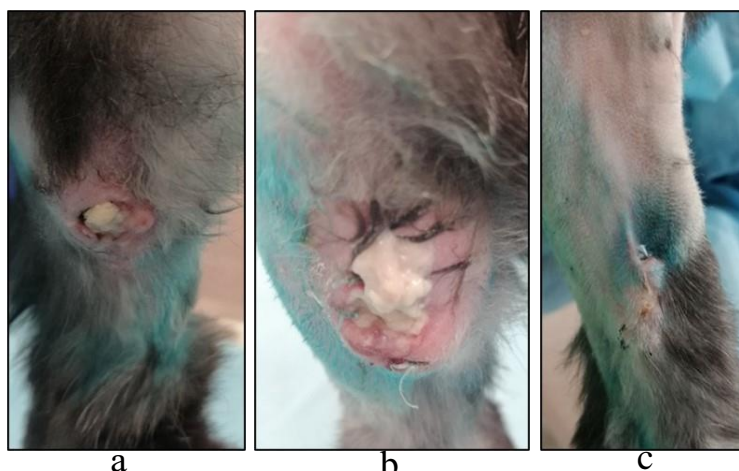


Рисунок 4.2. Локальный статус оперированной конечности у кроликов на 21 сутки инфицирования: а, б – рана с гнойным отделяемым в проксимальном отделе голени; с – послеоперационный рубец голени без явных клинических симптомов остеомиелита

Таблица 6 – Лабораторные показатели крови в норме и на 21 сутки после инфицирования большеберцовой кости кроликов

Показатели крови	Норма	На 21 сутки после инфицирования ($\mu \pm Sd$)		
		Опытная группа (n=11)	Сравнительная группа (n=11)	Контрольная группа (n=3)
Нь	110-136	104,6 \pm 6,5	107,4 \pm 8,8	108,3 \pm 10,6
WBC	2,5-6,9	11,1 \pm 1,8	10,5 \pm 2,2	9,6 \pm 1,9
СОЭ	1-4	8,8 \pm 3,4	8,5 \pm 3,1	6,3 \pm 2,1
СРБ	0-1	41 \pm 15,5	43 \pm 16,3	36 \pm 22,6

На рентгенограммах оперированной голени через 3 недели после инфицирования отмечали признаки, характерные для хронического остеомиелита (рисунок 4.3): неоднородная структура костной ткани, чередование очагов остесклерозирования с зонами просветления, снижение плотности костной ткани (остеопороз), периостальная реакция с различной степенью напластования, размытость контуров дефекта, а также секвестрация кости, обнаруженная в 7 (28 %) случаях.

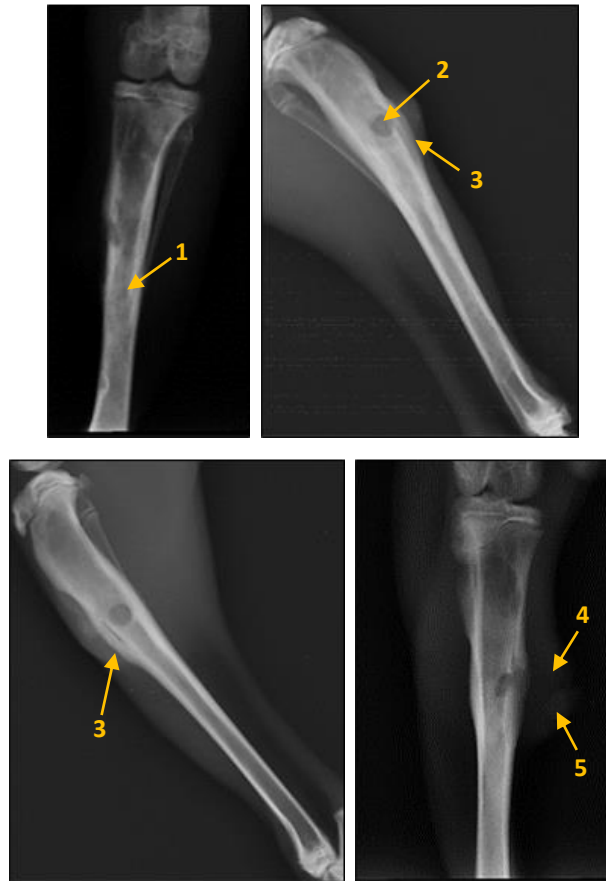


Рисунок 4.3. Рентгенограммы голени кроликов на 21 сутки моделирования хронического остеомиелита: 1 – неоднородная структура костной ткани; 2 – посттрепанационное отверстие; 3 – периостит; 4 – абсцесс; 5 – свищ

Микробиологическое исследование отделяемого свища (n=15) и интраоперационных биоптатов, взятых у всех кроликов (n=25) во время санации, идентифицировал рост ранее введенного нами штамма *MSSA*.

Гистологическое исследование трепанобиоптатов большеберцовой кости (рисунок 4.4) показало, что кортикальная пластинка в области моделирования хронического остеомиелита была представлена пластинчатой костной тканью с правильно сформированными остеонами. В центре последних проходил кровеносный сосуд и имелось небольшое количество ретикулярной стромы. Линии склеивания костных пластинок были регулярными. В половине случаев обнаруживали умеренно выраженный поднадкостничный остеогенез с формированием ретикулофиброзной и пластинчатой костной ткани, сохраняющей губчатое строение на момент

исследования. В другой половине наблюдали субкортикальную реакцию в виде образования ретикулофиброзной костной ткани в просвете костномозгового канала (рисунок 4.5). При этом, выраженной пролиферации остеобластических клеток не обнаружено, костное вещество новообразованной костной ткани имело признаки компактизации.

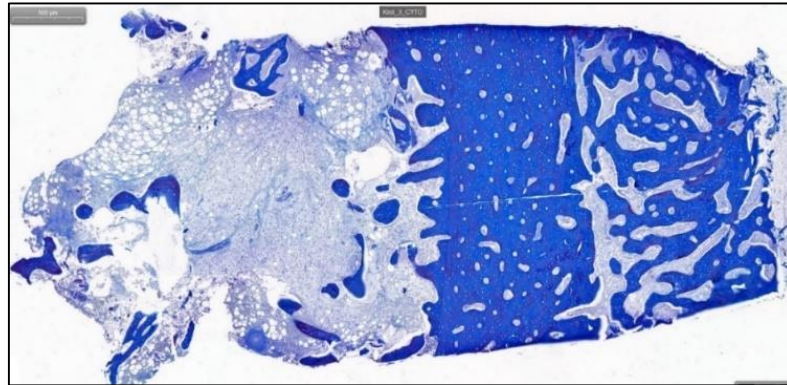


Рисунок 4.4. Гистопантограмма трепанобиоптата из области моделирования хронического остеомиелита. Поднадкостничная реакция.

Окраска по Маллори.

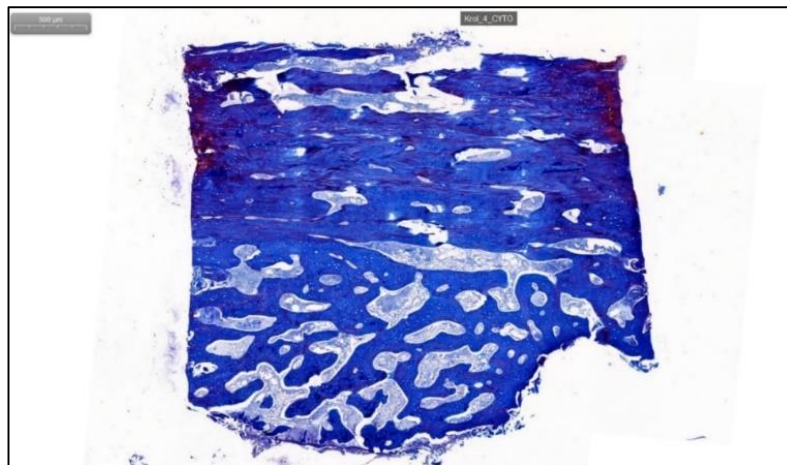


Рисунок 4.5. Гистопантограмма трепанобиоптата из области моделирования хронического остеомиелита. Субкортикальная реакция.

Окраска по Маллори.

В ретикулярной строме костного мозга и гаверсовых каналах кортикальной пластинки присутствовали липоциты в умеренном и значительном количествах. Перегородки как между отдельными липоцитами, так и их группами, были утолщены и изобиловали фибробластоподобными

клетками, нежными базофильными и оксифильными волокнами, между которыми выявляли в умеренном и значительном количествах клетки лимфоцитарного и плазмоцитарного ряда (рисунки 4.6 и 4.7).

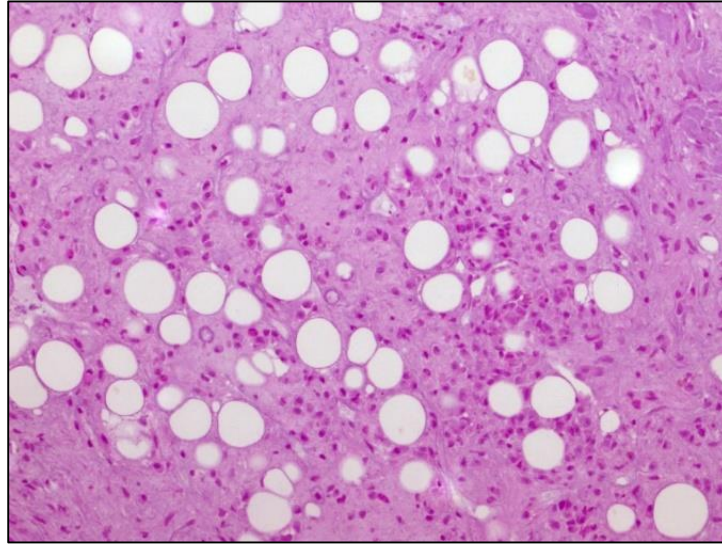


Рисунок 4.6. Микропрепарат фрагмента трепанобиоптата большеберцовой кости на 21 сутки инфицирования. Инфильтрация костного мозга лимфоцитами и плазмоцитами. Окраска гематоксилином и эозином. X200.

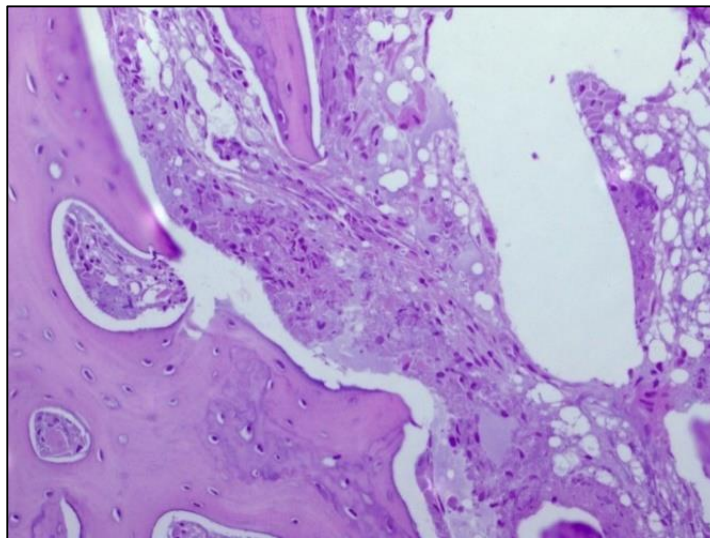


Рисунок 4.7. Микропрепарат фрагмента трепанобиоптата большеберцовой кости на 21 сутки инфицирования. Инфильтрация костного мозга и ретикулярной стромы гаверсовых каналов лимфоцитами и плазмоцитами. Окраска гематоксилином и эозином. X200.

Поля пластинчатой кости, наблюдаемые в самом веществе костного мозга и некоторых балках губчатой кости, были лишены остецитов, лакуны

которых на большом и малом протяжении пустовали. Гаверсовы каналы были несколько расширены и чередовали в себе признаки пазушной резорбции и остеорепаративной регенерации, представленной в виде напластований нового костного вещества с сохранными остеоцитами и причудливыми изгибами линий склеивания костных пластинок (рисунок 4.8). При этом, резорбирующийся костный матрикс, расположенный на границе с воспалительным инфильтратом, имел резкооксифильную каёмку, что косвенно свидетельствовало о локальном закислении межклеточного вещества и, следовательно, продолжающемся воспалительном процессе.

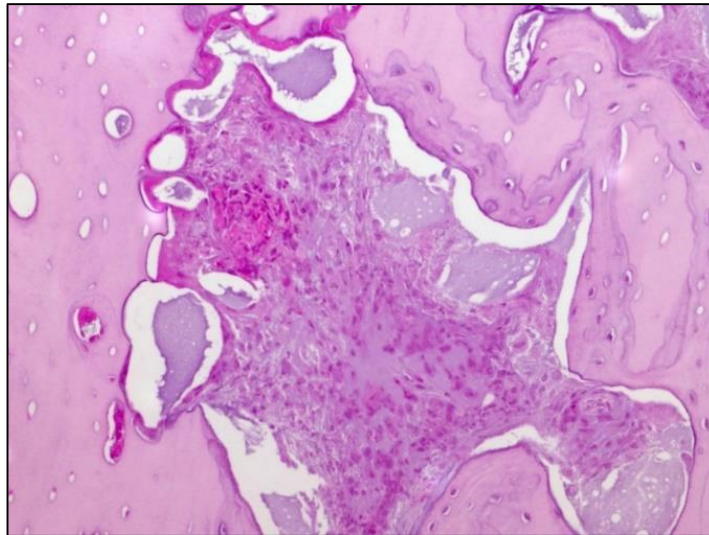


Рисунок 4.8. Микропрепарат фрагмента трепанобиоптата большеберцовой кости на 21 сутки инфицирования. Поля костного матрикса, лишённые остеоцитов. Пазушная резорбция кости. Инфильтрация костного мозга гаверсовых каналов лимфоцитами и плазмócитами. Окраска гематоксилином и эозином. X200.

Таким образом, полученные нами результаты клинико-лабораторной картины, рентгенологического, микробиологического и гистологического исследований, подтвердили развитие хронического остеомиелита большеберцовой кости кроликов к 21 суткам этапа инфицирования.

4.2. Результаты хирургического лечения экспериментального хронического остеомиелита большеберцовой кости в изучаемых группах

4.2.1. Клиническая оценка локального статуса оперированной конечности и общего состояния кроликов

На 3 сутки после хирургической санации в опытной группе (n=11) наблюдалась положительная динамика в снижении отека голени, гиперемии и гипертермии кожных покровов, отделяемое из раны было серозным. В 7 (63,6 %) случаях в сравнительной группе (n=11) и в 2 случаях в контрольной группе (n=3) признаки воспаления сохранялись, отделяемое из раны было серозно-геморрагическим в умеренном количестве. Температура тела в опытной и сравнительной группах колебалась в пределах верхней границы нормы (39,5 °С). В контрольной группе температура тела держалась на том же уровне, что и до хирургической санации очага инфекции (43,5 °С).

На 7 сутки исследования кролики из группы гидрогеля передвигались с полной опорой и незначительной хромотой на оперированную конечность. Послеоперационная рана заживала без признаков воспаления, швы были состоятельными. Серозное отделяемое из раны отмечено у 2 (18,2 %) кроликов, при этом локальных признаков воспаления у данных животных не наблюдалось (рисунок 4.9, а). Температура тела во всех случаях держалась в пределах нормы. Вес тела в среднем увеличился на 571 г.

Необходимо отметить, что у 1 кролика из этой группы в процессе забора крови из ушной вены произошло травмирование оперированной голени по причине активного дергания конечностями во время фиксации животного. При осмотре в проксимальной трети голени отмечалась патологическая подвижность. На контрольных рентгенограммах диагностирован перелом большеберцовой кости в проекции дефекта со смещением костных отломков (рисунок 4.10). В тот же день выполнена открытая репозиция отломков и остеосинтез большеберцовой кости 2 спицами Киршнера диаметром 1,3 мм. Поскольку в процессе выполнения манипуляций часть гидрогеля из

костномозгового канала вытекла, нами выполнено дополнительное заполнение канала гидрогелевым материалом, импрегнированным цефазолином в той же дозировке. В последующем в течение 3 дней в целях профилактики присоединения вторичной инфекции данному кролику проводилась системная антибактериальная терапия внутримышечным введением цефазолина в дозировке 30 мг/кг 3 раза в день.

В сравнительной группе к 7 суткам нормальное заживление раны отмечено у 5 (45,5 %) животных. У других 5 (45,5 %) наблюдалось отделяемое из раны в умеренном количестве, из которых серозный и серозно-гнойный характер имели по 2 (18,2 %) кролика, серозно-геморрагический - 1 (9,1 %). В последнем случае отделяемое сопровождалось расхождением краев раны в проксимальной трети до 0,2 см и умеренным отеком голени. Еще у 1 (9,1 %) животного отмечено формирование инфильтрата в верхней трети раны с гипертермией кожного покрова (рисунок 4.9, б). Все 6 животных были с низкой активностью и плохим аппетитом. Вследствие чего, данным кроликам начата системная внутримышечная антибактериальная терапия цефазолином по 30 мг/кг 3 раза в день.

В контрольной группе к 7 суткам отмечена небольшая положительная динамика в снижении температуры тела до 41 °С, но гиперемия и гипертермия кожных покровов в области послеоперационной раны и серозное отделяемое в умеренном количестве сохранялись у всех животных. Масса тела данных животных в среднем увеличилась на 470 г и составила 2764 г.

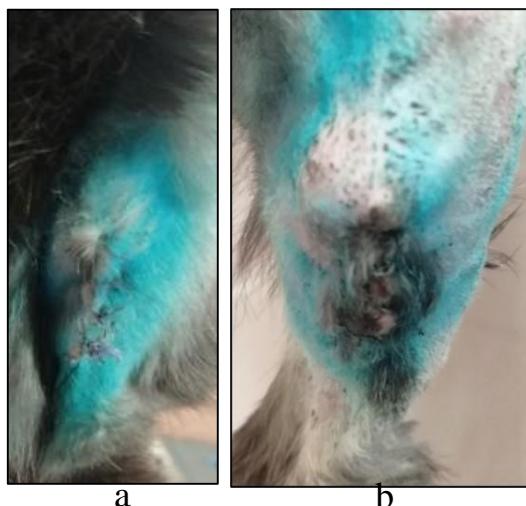


Рисунок 4.9. Внешний вид послеоперационной раны голени на 7 сутки после хирургической санации: а – опытная группа; б – сравнительная группа (инфильтрат в верхней трети раны)



Рисунок 4.10. Кролик опытной группы на 7 сутки после хирургической санации: перелом проксимального отдела диафиза правой большеберцовой кости со смещением костных отломков

Через 2 недели после санирующей операции у 10 (91 %) животных опытной группы констатировано полное заживление послеоперационной раны голени, область вмешательства частично заросла шерстью, швы были сняты (рисунок 4.11). У кролика, перенесшего открытую репозицию большеберцовой кости, заживление раны протекало без осложнений (рисунок 4.12), хромоты на оперированную конечность не наблюдалось. Температура тела у всех животных группы в среднем составила $38,7 \pm 0,3$ °С.

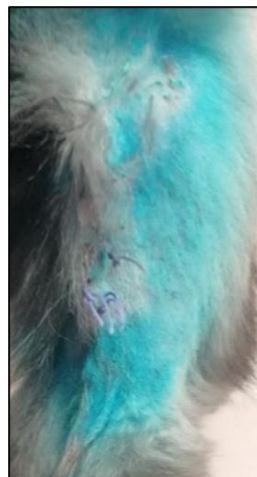


Рисунок 4.11. Внешний вид послеоперационной раны голени на 14 сутки после хирургической санации в опытной группе



Рисунок 4.12. Внешний вид послеоперационной раны голени у кролика опытной группы на 14 сутки после санации и на 7 сутки после открытого остеосинтеза большеберцовой кости

В сравнительной группе к 14 суткам швы сняты 7 (63,6 %) животным. В 18,2 % (n=2) случаев по-прежнему сохранялось серозно-гнойное раневое отделяемое, в 9,1 % (n=1) – диастаз между краями раны увеличился до размеров 2x0,6 см, заживление происходило под струпом (рисунок 4.13, а). У 1 животного, несмотря на внутримышечное введение антибиотика, область инфильтрата не регрессировала, при этом сохранялись умеренная гипертермия и гиперемия кожных покровов (рисунок 4.13, б). Всем 4 (36,4 %) животным с осложненным послеоперационным течением продолжена системная антибактериальная терапия.

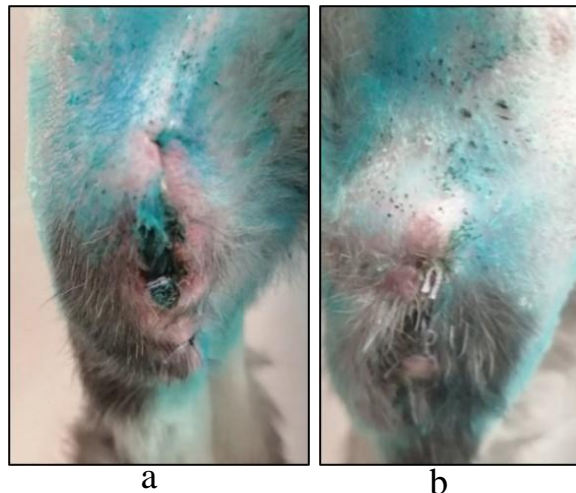


Рисунок 4.13. Внешний вид послеоперационной раны голени на 14 сутки после хирургической санации в сравнительной группе: а – расхождение краев раны, заживление раны под струпом; б – инфильтрат с гиперемией в верхней трети послеоперационной раны

В контрольной группе послеоперационные раны полностью зажили в 2 случаях. Однако у одного из них в области оперативного вмешательства визуально отмечалось образование вытянутой формы, которое при пальпации имело костную плотность (рисунок 4.14, а, б), хромоты на оперированную конечность не наблюдалось. У третьего животного в проксимальной и дистальной трети рубца имелись небольшие диастазы размером 0,3х0,2 и 0,2х0,2 см соответственно со скудным серозным отделяемым (рисунок 4.14, с). Температура тела во всех наблюдениях (n=3) составила 40,5 °С, что несколько выше верхней границы нормы. При этом масса тела в среднем достигла 3323 г.

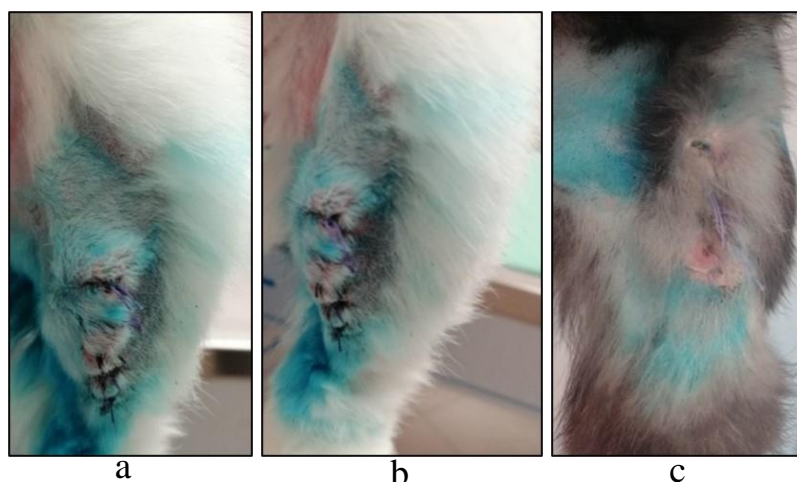


Рисунок 4.14. Внешний вид послеоперационной раны голени на 14 сутки после хирургической санации в контрольной группе: а – образование в области оперативного вмешательства в прямой проекции; б – образование в боковой проекции; с – вторичное заживление раны в проксимальной и дистальной трети рубца

К 21 суткам после первого этапного выведения животных из эксперимента в опытной и сравнительной группах осталось по 9 кроликов, в

контрольной – 2. В опытной группе, спустя 3 недели после санации, воспалительных признаков в области оперативного вмешательства не наблюдалось. Животные были активными, передвигались без хромоты с полной опорой на оперированную конечность. У кролика, перенесшего открытую репозицию большеберцовой кости, рана зажила полностью, швы были сняты (рисунок 4.15). В сравнительной группе только у 1 (9,1 %) животного с осложненным течением достигнуто купирование инфекционно-воспалительного процесса, в 3 (27,3 %) случаях воспаление продолжалось. Так у одного из них заживление раны происходило вторично под частично отошедшим струпом. После его полного удаления оголилась рана размером 0,3x0,5 см с мягкими тканями на дне (рисунок 4.16, а). Кроме того, в проекции раны голень была деформирована. У остальных животных этой группы (55,6 %) рецидива инфекции к данному сроку не наблюдалось, прибавка в весе и активность не отличались от кроликов опытной группы. В контрольной группе у одного из кроликов на фоне полного благополучия развился рецидив инфекции, который проявился формированием инфильтрата в верхней трети рубца с умеренной гипертермией и отеком голени (рисунок 4.16, б). У второго животного размер образования прогрессировал, пальпация была болезненной, сохранялись гипертермия и отек голени. В обоих контрольных наблюдениях температура тела была несколько повышенной (до 41,4 °С), активность – низкой. Масса тела в среднем составила 3945 г.

В связи с продолжающимся инфекционно-воспалительным процессом 3 животным сравнительной группы и контрольным кроликам была продолжена системная антибактериальная терапия с увеличенной дозировкой цефазолина до 40 мг/кг внутримышечно 3 раза в день.



Рисунок 4.15. Внешний вид послеоперационной раны правой голени кролика опытной группы на 21 сутки после хирургической санации и на 14 сутки после открытого остеосинтеза большеберцовой кости

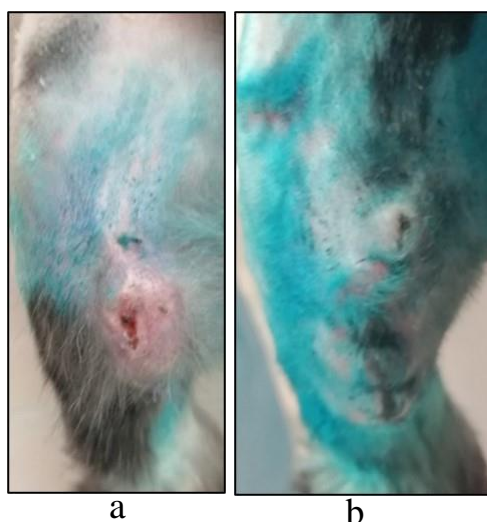


Рисунок 4.16. Внешний вид оперированной конечности на 21 сутки после санации: а - сравнительная группа; б – контрольная группа

На 28 сутки после санации в опытной группе рецидива инфекционно-воспалительного процесса не зафиксировано. В сравнительной группе у 3 (33,3 %) кроликов (при $n=9$) и 2 животных из контрольной группы в области оперативного вмешательства по-прежнему отмечали воспалительные признаки, сопровождающиеся низкой активностью и прихрамыванием на оперированную конечность. Повышенная температура тела (до 41,7 °С) зафиксирована только в контрольной группе, при этом масса тела данного кролика составила 4751 г. Стоит отметить, что у кролика контрольной группы в проекции послеоперационного рубца голени визуально определялась уже

выраженная деформация (рисунок 4.17). Как выяснилось позже из рентгенограмм, деформация была вызвана не прогрессирующей периостальной реакцией, а наличием костной мозоли в проксимальном отделе большеберцовой кости.

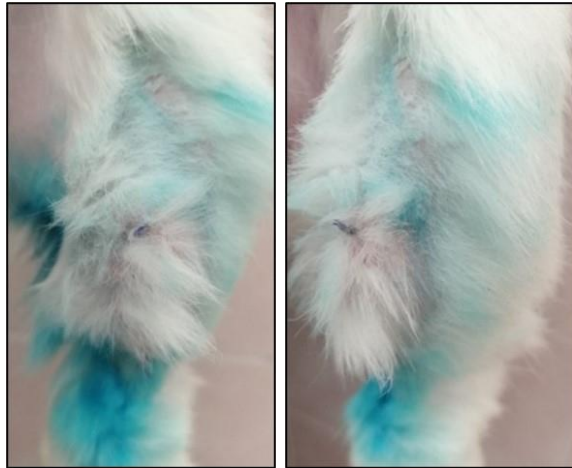


Рисунок 4.17. Внешний вид оперированной конечности на 28 сутки после санации в контрольной группе: деформация голени в проекции послеоперационного рубца

К 35 суткам в опытной группе (n=7 после второго этапного выведения) послеоперационный период протекал без осложнений. Все животные были активными, передвигались без хромоты, вес тела в среднем увеличился на 677 г. В сравнительной группе (n=7) в 57 % случаев область рубца была спокойной, наблюдалась такая же активность животных, что и в опытной группе, увеличение веса тела в среднем составило 631 г. Из трех животных с осложненным послеоперационным течением ремиссии инфекции удалось добиться только в одном, у 2 других животных (28,6 %) воспаление продолжалось. При этом у одного из них отмечена отрицательная динамика в виде расхождения краев раны до 1x0,7 см с оголением участка кости. Такая тенденция, по-видимому, была связана с прогрессированием гиперостоза большеберцовой кости (рисунок 4.18, а, б). У кролика контрольной группы (n=1) отмечено увеличение размера инфильтрата и появление умеренной гиперемии с гипертермией. При пальпации образования отмечалась флюктуация. Также по наружной поверхности инфильтрата были обнаружены

точечное изъязвление кожного покрова и точечные гнойнички (рисунок 4.18, с).

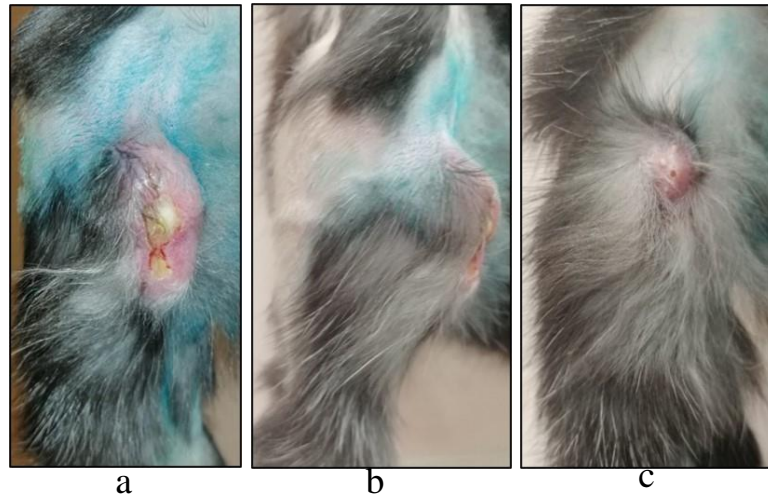


Рисунок 4.18. Внешний вид оперированной конечности на 35 сутки после хирургической санации: а, b – сравнительная группа; с – контрольная группа

На 42 сутки в опытной группе (n=7) признаков воспаления не наблюдалось, область послеоперационного рубца полностью заросла шерстью (рисунок 4.19). В сравнительной группе (n=7) в 2 осложненных случаях на фоне усиленной системной антибактериальной терапии наблюдалась некоторая положительная динамика в виде сужения краев раны (рисунок 4.20, а) и уменьшения размеров инфильтрата (рисунок 4.20, b, с). У остальных 5 (71,4 %) животных рецидива инфекции не зарегистрировано, область рубца полностью заросла шерстью. В контрольной группе положительная динамика проявилась в устранении гиперемии и участков изъязвления, сам инфильтрат не регрессировал, сохранялась гипертермия (рисунок 4.21). Температура тела у данного кролика к концу исследования составила 40,7 °С, а масса тела увеличилась с 5393 до 6116 г.

Межгрупповые статистические данные веса тела животных опытной и сравнительной групп в динамике представлены в таблице 7.



Рисунок 4.19. Внешний вид оперированной конечности в опытной группе на 42 сутки после хирургической санации

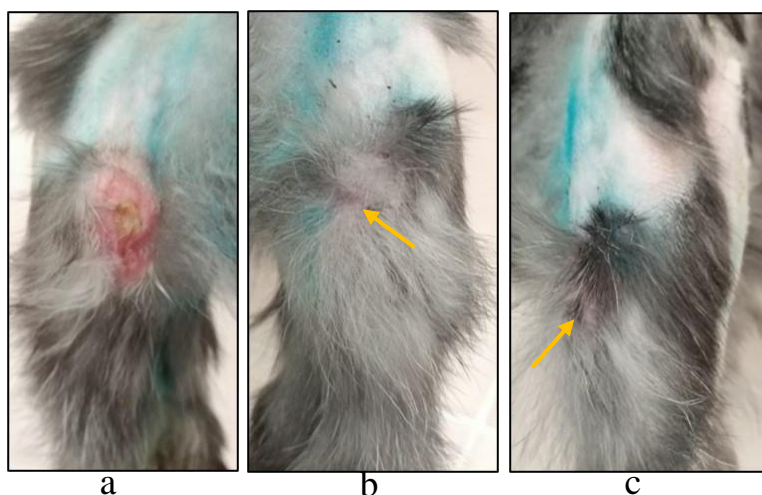


Рисунок 4.20. Внешний вид голени на 42 сутки после хирургической санации в сравнительной группе: а – с вторичным заживлением раны; б, с – прямая и боковая проекции остаточного плотного инфильтрата (указан стрелкой) в верхней трети рубца



Рисунок 4.21. Внешний вид голени на 42 сутки после хирургической санации в контрольной группе

Таблица 7 – Статистические данные веса кроликов в опытной и сравнительной группах после хирургической санации в контрольные дни исследования

День наблюдения	Опытная группа ($\mu \pm Sd$)	Сравнительная группа ($\mu \pm Sd$)	<i>p</i> value (критерий Манна-Уитни)
3	2418 \pm 110,7	2435 \pm 126,3	<i>p</i> =0,870
7	2989 \pm 139,9	2909 \pm 140,9	<i>p</i> =0,279
14	3639 \pm 213,5	3512 \pm 200,7	<i>p</i> =0,324
21	4223 \pm 263,5	4012 \pm 274,8	<i>p</i> =0,123
28	4901 \pm 280,8	4544 \pm 306,7	<i>p</i> =0,006
35	5578 \pm 263,1	5175 \pm 324,2	<i>p</i> =0,005
42	6308 \pm 152,3	5948 \pm 283,3	<i>p</i> =0,000

4.2.2. Результаты лабораторных показателей крови

В опытной группе на всем протяжении исследования с момента выполненной хирургической санации уровень гемоглобина постепенно увеличивался по сравнению с остальными изучаемыми группами. У кроликов с гидрогелем значения показателя к концу наблюдения достигли 122-132 г/л, у животных с костным цементом – 120-131 г/л. В 2 (18,2 %) случаях в сравнительной группе к 42 суткам диагностирована анемия, где уровень Hb составил 98 и 99 г/л — это были кролики с клинически осложненным послеоперационным заживлением раны. В контрольной группе определенной динамики уровня гемоглобина за все время исследования не удалось зафиксировать, поскольку значения постоянно колебались в сторону возрастания и убывания.

При изучении уровня лейкоцитов (WBC) значимых межгрупповых различий в течение 7 дней после санации не зафиксировано. Первые отличия отмечены на 14 сутки наблюдения: в опытной группе данный маркер воспаления в среднем составил $7,4 \times 10^9/\text{л}$, в сравнительной и контрольной группах – $8,7$ и $8,1 \times 10^9/\text{л}$ соответственно. К 3 неделе исследования у животных с гидрогелем уровень WBC продолжал снижаться, в то время как в двух других группах значения не изменились. С 28 по 42 сутки в основной группе лейкоциты в среднем снизились с $5,4$ до $3,9 \times 10^9/\text{л}$, в сравнительной группе – с $14,3$ до $11,8 \times 10^9/\text{л}$. В контрольной группе, напротив, на 42 сутки лейкоциты повысились с $6,8$ до $7,9 \times 10^9/\text{л}$, что косвенно указывало на рецидив инфекции.

Первое межгрупповое различие в уровнях СОЭ зафиксировано только на 35 сутки, где значения показателя для кроликов с гидрогелем и костным цементом в среднем составили $1,7$ и $3,1$ мм/ч соответственно. В контрольной группе с 28 по 35 сутки маркер воспаления был стабильным, но к 42 суткам уровень его повысился в 2 раза. Стоит отметить, что СОЭ в нашем исследовании не был столь чувствительным маркером воспаления как WBC и СРБ, поскольку, несмотря на продолжающийся процесс воспаления у некоторых животных, уровень его в среднем варьировал от 2 до 3 мм/ч, также как и у кроликов с нормальным послеоперационным течением и заживлением раны.

С-реактивный белок на 3 сутки после санации в опытной и контрольной группах был практически одинаков и составил в среднем 35 и 37 мг/л соответственно. В сравнительной группе уровень маркера на те же сутки в среднем достиг 42 мг/л, что связано с ростом показателя в первые послеоперационные дни у 6 из 11 кроликов. Первоначальная тенденция к межгрупповым различиям в уровнях маркера наметилась к 14 суткам: более эффективное снижение СРБ наблюдалось в опытной группе по сравнению со сравнительной и контрольной группами – $15,1$ мг/л против $19,8$ и $17,7$ мг/л соответственно. Значимые различия зафиксированы с 21 суток после санации. К концу исследования показатель существенно упал в основной группе - до

2,7 мг/л. В сравнительной группе, несмотря на повышенный уровень маркера (14-36 мг/л) у 28,6 % животных, в целом также наблюдается его снижение (до 11,8 мг/л), однако оно не было столь эффективным как в группе кроликов с имплантированным полимерным гидрогелем. В контрольной группе, напротив, СРБ повысился до 24 мг/л, что указывает на рецидив остеомиелита большеберцовой кости.

Динамика лабораторных показателей крови для опытной и сравнительной групп представлена в виде среднеарифметических значений со стандартным отклонением в таблице 8.

Статистические данные показателей крови в контрольные сроки исследования для опытной и сравнительной групп продемонстрированы в таблице 9.

Таблица 8 – Динамика показателей крови в контрольные дни исследования у кроликов опытной и сравнительной групп

День	Опытная группа ($\mu \pm Sd$)				Сравнительная группа ($\mu \pm Sd$)			
	НВ (N=110-136)	WBC (N=2,5-6,9)	СОЭ (N=1-4)	СРБ (N=0-1)	НВ (N=110-136)	WBC (N=2,5-6,9)	СОЭ (N=1-4)	СРБ (N=0-1)
3	115,2±9,7	9,4±1,1	4,6±2,1	35,1±5,7	115, ±12,1	10,1±1,9	5±1,8	42±11,6
7	117,1±7,3	8,6±1	3,6±1,6	23,5±10,1	116,1±5,9	9,6±1,8	4,1±1,7	29±13,1
14	122,2±6,2	7,4±1,5	3,5±2,7	15,1±8,7	117,2±11,7	8,7±1,7	3,8±1,8	19,8±15,5
21	124,2±8,2	6,9±2,8	2,5±0,7	12,5±12,6	119, ±12,6	8,8±2,4	3,3±1,5	18,3±8,1
28	129,6±7,4	5,4±2,3	3±2,5	8,2±7,7	121,8±17,9	8,1±3,5	3,6±2,1	14,3±5,5
35	128±5,8	5,2±3,2	1,8±1	4,7±4,1	120±19,1	8,1±3,6	3,4±1,9	14,7±10,1
42	129,7±4,5	3,9±1,5	1,7±1,1	2,7±4,1	119±14,3	7,7±4,5	3,1±2,4	11,8±9,4

Таблица 9 – Статистические различия уровней маркеров воспаления у кроликов опытной и сравнительной групп (критерий Манна-Уитни)

Показатели крови	3 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки	28 сутки	35 сутки	42 сутки
НВ	0,478	0,478	0,606	0,297	0,436	0,209	<i>0,053**</i>
СОЭ	0,748	0,652	0,332	0,340	0,258	<i>0,097</i>	0,383
WBC	0,478	0,151	0,040*	0,024	0,040	<i>0,053</i>	0,011
СРБ	0,116	0,519	0,562	0,040	<i>0,063</i>	0,011	0,011

* Статистически значимые различия ($p < 0,05$) для полимерного гидрогеля выделены жирным шрифтом.

** Статистические значения, где $0,05 < p < 1$, выделены курсивом.

4.2.3. Результаты лучевого исследования

Как таковых видимых рентгенологических различий костной ткани на 3 сутки после санации между изучаемыми группами не выявлено. На рентгенограммах отмечали посттрепанационные отверстия по медиальной поверхности в проксимальном отделе большеберцовой кости с четкими ровными контурами. Диаметр верхне расположенного дефекта составил 6 мм, нижнего – 4 мм, в 16 % (n=4) случаев в результате секвестрнекрэктомии дефект представлял собой единое отверстие размером в среднем около 0,8x0,6 см. В опытной группе на снимках имплантированный гидрогель не визуализировался (рисунок 4.22), в сравнительной группе в костномозговом канале определялся солитарный костный цемент (рисунок 4.23).

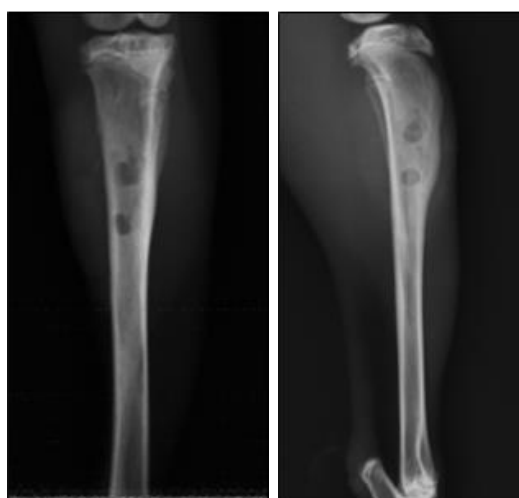


Рисунок 4.22. Рентгенограммы левой голени кролика с гидрогелем на 3 сутки после санации



Рисунок 4.23. Рентгенограммы левой голени кролика с костным цементом на 3 сутки после санации

На рентгенограммах на 15 сутки исследования в опытной группе по сравнению с 3 сутками видимых рентгенологических изменений костной ткани оперированного сегмента не выявлено. Прогрессирования периостальной реакции, остеосклероза не наблюдалось, очаги деструкции не обнаружены. Контуры кортикальных стенок ровные и практически не изменились (рисунок 4.24). У кроликов в сравнительной группе диафиз в проксимальном отделе большеберцовой кости утолщен за счет линейных периостальных наслоений, зона склерозирования распространилась до средней трети кости, плотность костной ткани несколько снизилась. В одном случае в проксимальной трети в медиальной кортикальной стенке между двумя посттравматическими отверстиями был обнаружен мелкий секвестр. В костномозговом канале визуализируется солитарный цемент с зоной резорбции на границе с костной тканью (рисунок 4.25).

В контрольной группе к 15 суткам на рентгенограммах сохранялась картина хронического воспаления костной ткани: структура ткани неоднородная с чередующимися участками разрежения и остеосклероза. При этом, зона остеосклероза распространилась на среднюю треть большеберцовой кости. Кортикальные стенки несколько неровные и утолщены за счет

периостита. Область дефекта не визуализирована, ввиду периостального напластования (рисунок 4.26).

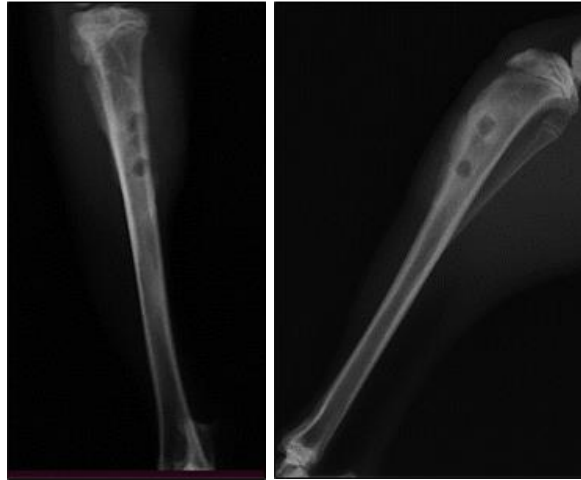


Рисунок 4.24. Рентгенограммы правой голени кролика опытной группы в стандартных проекциях на 15 сутки после санации (перед выводом)



Рисунок 4.25. Рентгенограммы левой голени кролика сравнительной группы в стандартных проекциях на 15 сутки после санации (перед выводом). В костномозговом канале большеберцовой кости визуализируется костный цемент

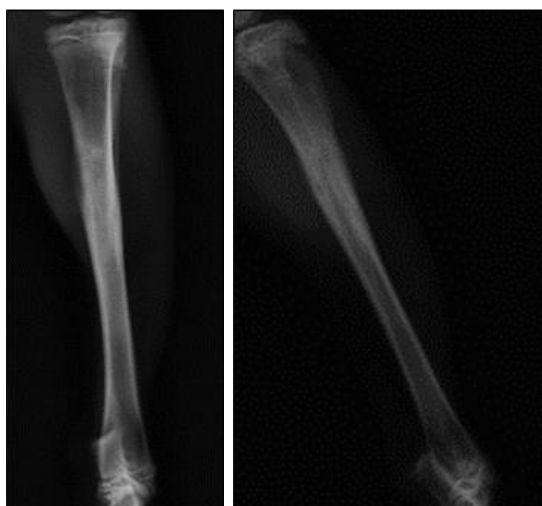


Рисунок 4.26. Рентгенограммы левой голени кролика контрольной группы в стандартных проекциях на 15 сутки после санации (перед выводом)

На 30 сутки в исследуемой группе кроликов с имплантированным гидрогелем рентгенологических признаков продолжающегося или прогрессирующего хронического остеомиелита не выявлено. Контуры кортикальных стенок большеберцовой кости четкие, структура костной ткани однородная, остеосклероза, остеопороза и периостита не наблюдалось. Размеры дефектов несколько уменьшились, что говорит о постепенном их замещении костной тканью (рисунок 4.27). На рентгенограммах голени у кролика из опытной группы, которому был выполнен остеосинтез большеберцовой кости спицами, диагностирован срастающийся перелом большеберцовой кости с мостовидной гипертрофической костной мозолью по медиальной поверхности (рисунок 4.28). Зоны остеосклероза, регионарного остеопороза, а также секвестры на снимках у данного животного не обнаружены.

В сравнительной группе, напротив, имелась выраженная деформация в проксимальной трети большеберцовой кости, которая произошла за счет прогрессирующей периостальной реакции (рисунок 4.29). Контуры кортикальных стенок неровные. Склерозирование вокруг дефекта значительно усилилось, местами отмечались участки просветления. В самой полости

дефекта отчетливо виден солитарный костный цемент с признаками резорбции костной ткани на границе кость–цемент.

У кролика из контрольной группы на рентгенограммах в соответствии с его клиническим локальным статусом предполагалось увидеть характерный для продолжающегося хронического остеомиелита признак – гиперостоз. Однако вместо этого мы обнаружили консолидирующийся перелом проксимального отдела большеберцовой кости и неправильно сросшийся перелом малоберцовой кости (рисунок 4.30). Костная мозоль при этом была нормотрофической и более выраженной на конце центрального отломка, нежели периферического. По центру сращения большеберцовой кости выявлен секвестр, костная ткань вокруг последнего выражено склерозирована с небольшими зонами просветления. Таким образом можно предположить, что перелом большеберцовой кости без смещения костных отломков произошел при попытке полной нагрузки на оперированную конечность в период между 7 и 14 контрольными сроками.

Поскольку в контрольной группе у нас было ограниченное число кроликов – по одному на каждый контрольный срок выведения, – мы не стали исключать его из эксперимента, также как и кролика из опытной группы. Нами было принято решение вывести обоих животных из эксперимента на 30 сутки с целью сравнительного анализа процесса консолидации кости при имплантации гидрогеля и без него, а также гистологически подтвердить или опровергнуть влияние гидрогелевой матрицы на регенераторные способности костной ткани.



Рисунок 4.27. Рентгенограммы левой голени кролика с гидрогелем (опытная группа) в стандартных проекциях на 30 сутки после санации (перед выводом)



Рисунок 4.28. Рентгенограммы правой голени кролика из опытной группы в стандартных проекциях на 30 сутки после санации и на 23 сутки после открытого остеосинтеза правой большеберцовой кости: срастающийся перелом проксимального отдела правой большеберцовой кости

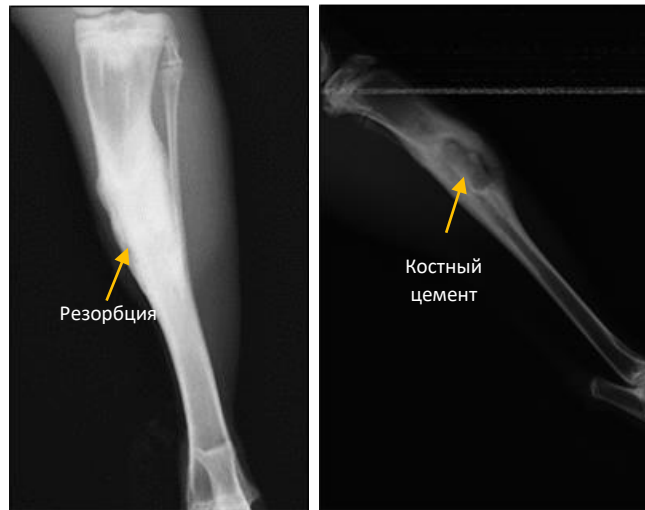


Рисунок 4.29. Рентгенограммы левой голени кролика с костным цементом (сравнительная группа) в стандартных проекциях на 30 сутки после санации (перед выводом)



Рисунок 4.30. Рентгенограмма правой голени кролика контрольной группы на 30 сутки после санации (перед выводом). Срастающийся перелом проксимального отдела диафиза большеберцовой кости с наличием секвестра (указан стрелкой)

К 45 суткам на рентгенограммах кроликов опытной группы наблюдалось заращение области дефектов костной тканью. Как показывают снимки в боковых проекциях (рисунок 4.31), размеры посттравматических отверстий значительно уменьшились по сравнению с исходными и контуры дефектов слабо визуализируются. Кортикальные стенки четкие, ровные без периостальной реакции. Костная структура однородная.

В сравнительной группе на рентгенограммах определялось булавовидное утолщение в проксимальном отделе большеберцовой кости за счет прогрессирующего периостита, который в большей степени был выражен по передней или медиальной поверхностям (рисунок 4.32). При этом, в толще периостального нароста определялась полость неправильной вытянутой формы с мелкой секвестроподобной тенью внутри. Контуры посттравматических отверстий в подавляющем большинстве были размыты и неровные. Структура самой костной ткани неоднородная с чередующимися участками склероза и просветления. В некоторых случаях отмечали распространение склерозирования до средней трети диафиза кости.

У кролика из контрольной группы к концу исследования наблюдалось утолщение проксимального отдела большеберцовой кости за счет периостальных наслоений, которые были особенно выражены по медиальной и передне-задней поверхностям (рисунок 4.33). Контуры кортикальных стенок неровные и утолщены, структура костной ткани патологически изменена с очагами остеосклероза и просветления. Костномозговой канал в верхней трети кости сужен. Область дефекта не визуализировалась по причине перекрытия этой зоны периостальными наслоениями.

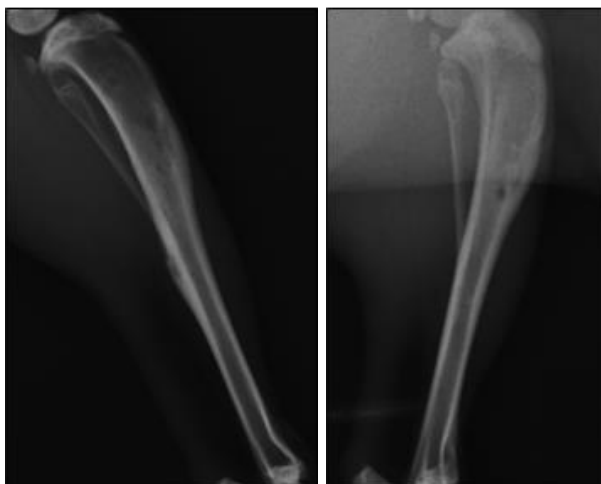


Рисунок 4.31. Рентгенограммы голеней кроликов с гидрогелем (опытная группа) в боковых проекциях на 45 сутки после санации (перед выводом)

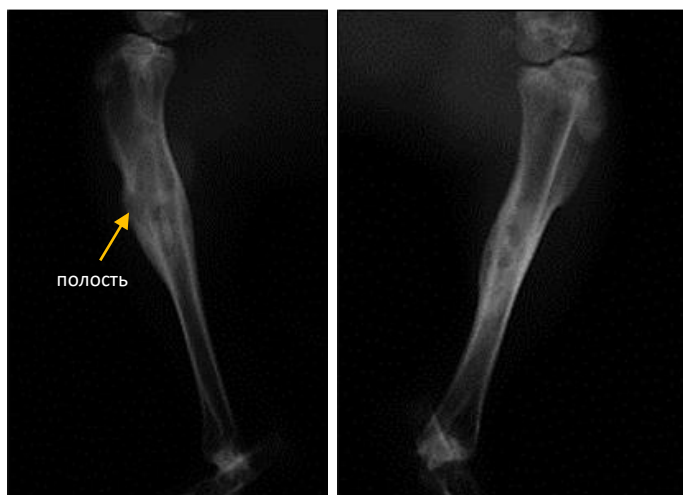


Рисунок 4.32. Рентгенограммы голени кроликов с костным цементом (сравнительная группа) в боковых проекциях на 45 сутки после санации (перед выводом)

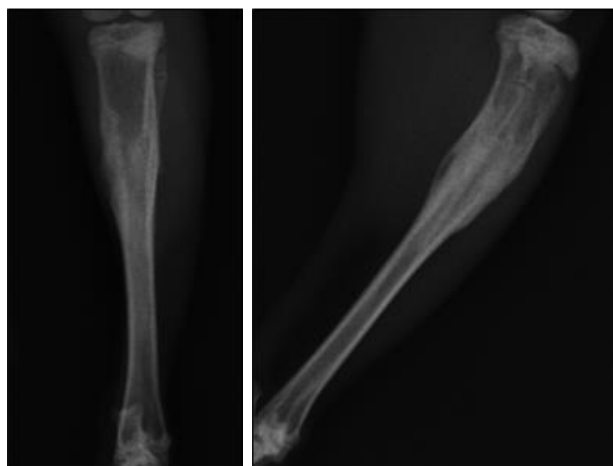


Рисунок 4.33. Рентгенограммы правой голени кролика контрольной группы в стандартных проекциях на 45 сутки после санации (перед выводом)

4.2.4. Результаты микробиологического исследования

Бактериологическое исследование раневого отделяемого у кроликов опытной группы не обнаружило роста микрофлоры на всем протяжении исследования. В сравнительной группе, напротив, на 3 сутки рост *MSSA* верифицирован в 45,5 % (n=5) случаев, на 7 сутки – в 36,4 % (n=4), на 14 сутки – в 18,2 % (n=2), в дальнейшем рост изолята определялся в отделяемом раны 1 (9,1 %) кролика. В контрольной группе на 3 и 7 послеоперационные сутки искомым штамм *S. aureus* выделен из отделяемого раны всех 3 животных, на 14 сутки – у 1 кролика. В остальные контрольные сроки бактериологический

посев в данной группе не производился по причине рубцевания раны и отсутствия отделяемого.

Микробиологическое исследование гидрогеля, извлеченного из костномозгового канала большеберцовой кости, и костной ткани, изъятой из области дефекта, не показало роста микрофлоры ни на одном этапе выведения. Только в одном случае выявлен рост *MSSA* в мягкотканом биоптате кролика, выведенного на 30 сутки исследования. Мы предполагаем, что это, скорее всего, результат контаминации, которая произошла при нарушении техники забора материала или его переносе в контейнер. Поскольку, ни на самом гидрогеле, ни в костной ткани и других участках мягких тканей, в том числе в исследованиях мазка области оперативного вмешательства, роста микрофлоры не обнаружено. Помимо всего, бактериологический анализ спиц, удаленных из голени данного кролика, также не выявил роста искомого микроорганизма.

В сравнительной группе положительный рост культуры *MSSA* как на самом костном цементе, так и в костных биоптатах получен у 1 (9,1 %) кролика, выведенного на 15 сутки, и 3 (27,3 %) кроликов – на 45 сутки эксперимента. Стоит отметить, что в последнем случае рост изолята идентифицирован у животного со стойкой ремиссией остеомиелита.

В контрольной группе рост микроба верифицирован из биоптатов кролика, выведенного на 15 сутки исследования. В остальных контрольных случаях забор материала для исследования без нарушения длинника кости не представлялся возможным, ввиду полного перекрытия области дефектов периостальными наслоениями и выраженного остеосклероза. Дополнительное микробиологическое исследование мазка с поверхности кости и прилежащих мягкотканых структур, в том числе гнойного детрита, обнаруженного в проекции инфильтрата в проксимальной трети голени кролика, выведенного на 45 сутки, не дало положительных результатов.

4.2.5. Результаты гистологического исследования

В группе кроликов с имплантированным гидрогелем на 15 сутки исследования фрагменты кости представляли собой костный регенерат с двумя кортикальными пластинками и костномозговым каналом (рисунок 4.34). Одна из пластинок имела выраженную эндостальную и периостальную реакции и значительный объем формирующейся ретикулофиброзной костной ткани с выраженной трабекуляризацией. Наличие последней также наблюдали и в костномозговом канале. В пространстве канала между желтым костным мозгом и соединительной тканью репаративного типа проходили обширные поля инородного гелеподобного вещества наподобие тяжистого полупрозрачного базофильного образования. Обращали на себя внимание гигантские клетки инородных тел, образующие симпласты вокруг гидрогеля (рисунок 4.35).

Между полями гелеподобных структур, находившихся в соединительной ткани регенераторного типа, обнаруживали множественные очаги первичного остеогенеза и трабекулярных структур из ретикулофиброзной костной ткани, поверхность которых содержала в себе большое число остеобластов (рисунок 4.36).

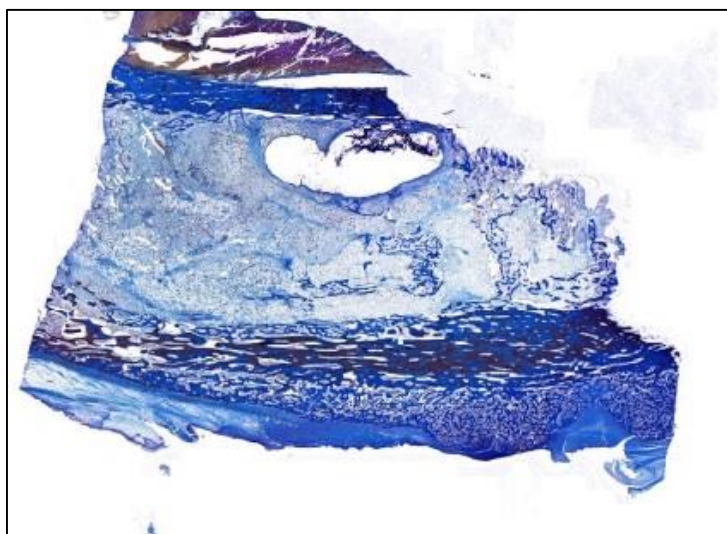


Рисунок 4.34. Гистопантомограмма продольного среза трубчатой кости кролика из опытной группы. Окраска по Маллори.

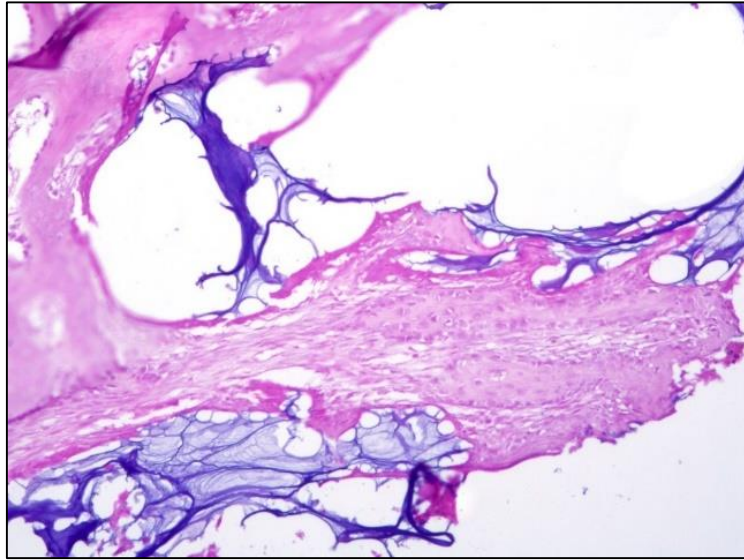


Рисунок 4.35. Фрагмент гистопантограммы продольного среза большеберцовой кости кролика на 15 сутки после имплантации гидрогеля. Гигантские клетки инородных тел образуют на его поверхности обширные симпласты. Окраска гематоксилин и эозин. X400.

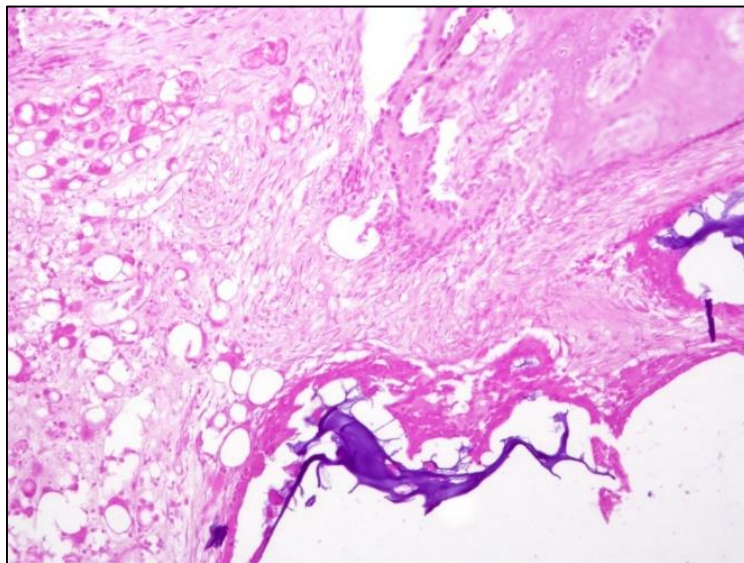


Рисунок 4.36. Фрагмент гистопантограммы продольного среза большеберцовой кости кролика на 15 сутки после имплантации гидрогеля. Костные трабекулы из ретикулофиброзной костной ткани с большим количеством остеобластов на поверхности. Окраска гематоксилин и эозин. X200.

На данном сроке в ретикулярной строме костного мозга и соединительной ткани регенераторного типа не выявляли значительного числа клеток лимфоцитарного ряда, нейтрофильные лейкоциты единичны,

несколько увеличенным было количество клеток макрофагального ряда (рисунок 4.37). Под действием резорбирующих клеток гель фрагментировался и расслаивался. В образовавшиеся промежутки проникала соединительная ткань регенераторного типа (рисунок 4.38).

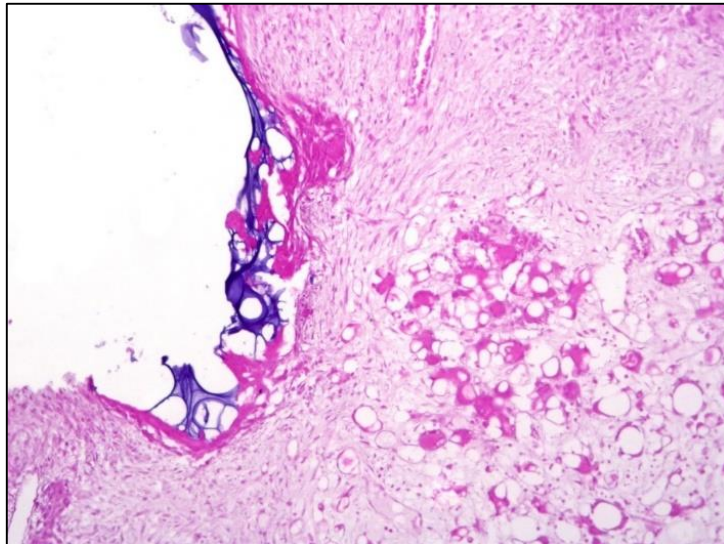


Рисунок 4.37. Фрагмент гистопантограммы продольного среза большеберцовой кости кролика на 15 сутки после имплантации гидрогеля. Гигантские клетки резорбируют гидрогель. Слабая инфильтрация клетками лимфоцитарного ряда ретикулярной стромы костного мозга. Окраска гематоксилин и эозин. X200.

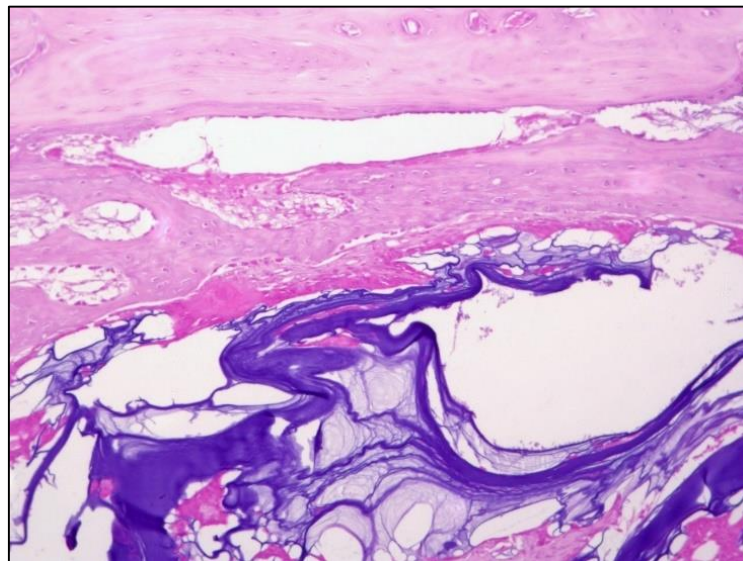


Рисунок 4.38. Фрагмент гистопантограммы продольного среза большеберцовой кости кролика на 15 сутки после имплантации гидрогеля.

Фрагментация и расслаивание гидрогеля гигантскими клетками инородных тел

На 15 сутки гистологически костный цемент представлял собой слоистые образования, напоминающие кристаллические структуры с ровными округлыми контурами (рисунок 4.39). Гранулы или поля цемента были окружены пластинчатой костной тканью трабекулярного строения и значительным воспалительным инфильтратом, который был представлен лимфоцитами и плазмócитами (рисунок 4.40), а в некоторых случаях содержал небольшое количество сегментоядерных нейтрофилов. Поля инфильтрата также обнаруживались между гранулами интрамедуллярно расположенного цемента (рисунок 4.41).

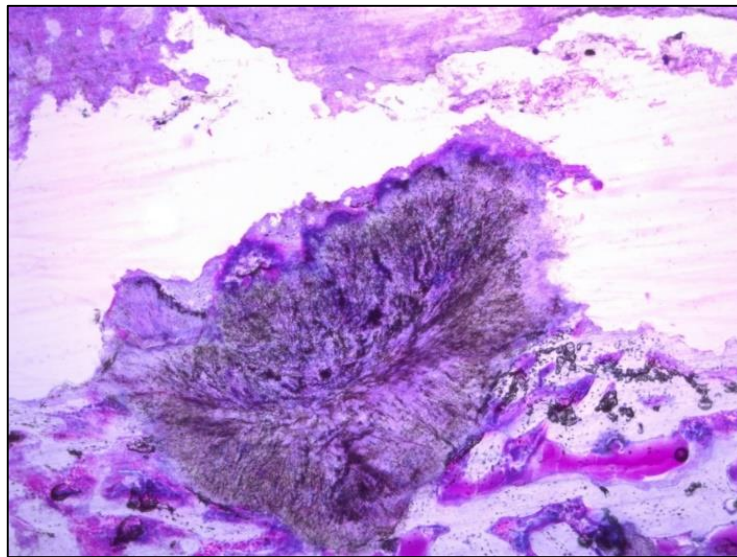


Рисунок 4.39. Гранула костного цемента слоистой структуры в окружении костной ткани и воспалительного инфильтрата. Окраска небесный трихром.

X50

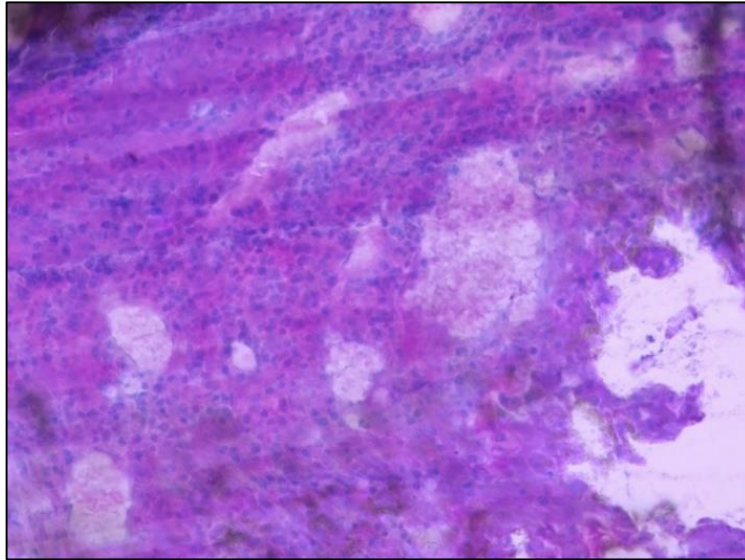


Рисунок 4.40. Воспалительный инфильтрат вокруг гранул костного цемента.
Инфильтрат представлен полиморфноядерными лейкоцитами. Окраска
небесный трихром. X200

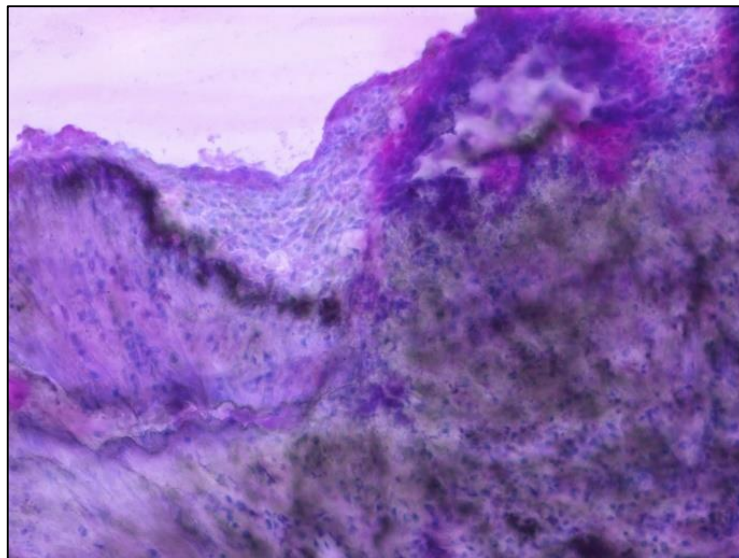


Рисунок 4.41. Воспалительный инфильтрат вокруг гранул костного цемента.
Окраска небесный трихром. X200

Собственно костный регенерат состоял преимущественно из пластинчатой костной ткани и в меньшей степени – из ретикулофиброзной, имеющих на своей поверхности большое число остеобластов. Отдельные гранулы костного цемента также наблюдали в формирующихся каналах Гаверса (рисунок 4.42).

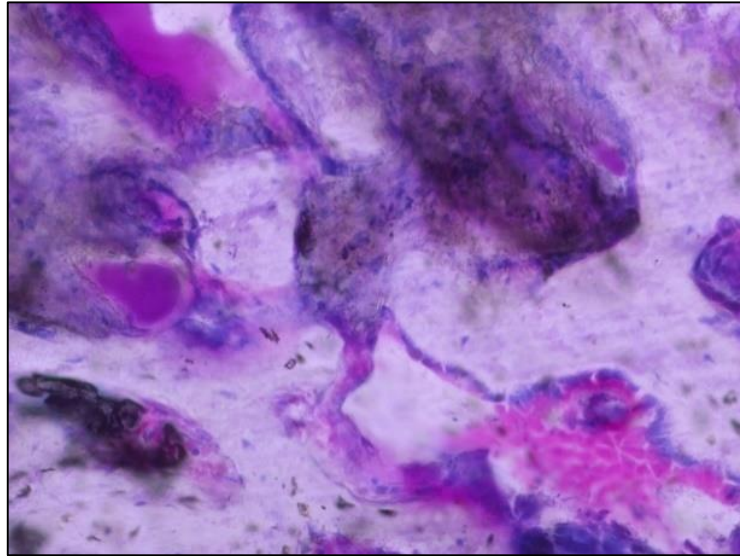


Рисунок 4.42. Костные трабекулы, представленные ретикулофиброзной костной тканью с остеобластами на поверхности. Внутри формирующихся каналов Гаверса гранулы костного цемента. Окраска небесный трихром.

X200

В контрольной группе на 15 сутки исследования фрагменты кости представляли собой костный регенерат с двумя кортикальными пластинками и костномозговым каналом. С выраженной эндостальной и периостальной реакцией. Интрамедуллярный остеогенез осуществлялся преимущественно за счет энхондрального окостенения (рисунок 4.43). В пространстве костномозгового канала между трабекулами обнаруживали значительные скопления клеток лимфо- и плазмоцитарного ряда (рисунок 4.44). Нейтрофильные лейкоциты практически не встречались. Сосуды ретикулярной стромы костного мозга полнокровны, местами в некоторых случаях наблюдали разрастания соединительной ткани регенераторного типа с первичным и вторичным остеогенезом. На поверхности формирующихся трабекул, представленных ретикулофиброзной костной тканью и хондроидом наблюдали большое количество остеобластов.

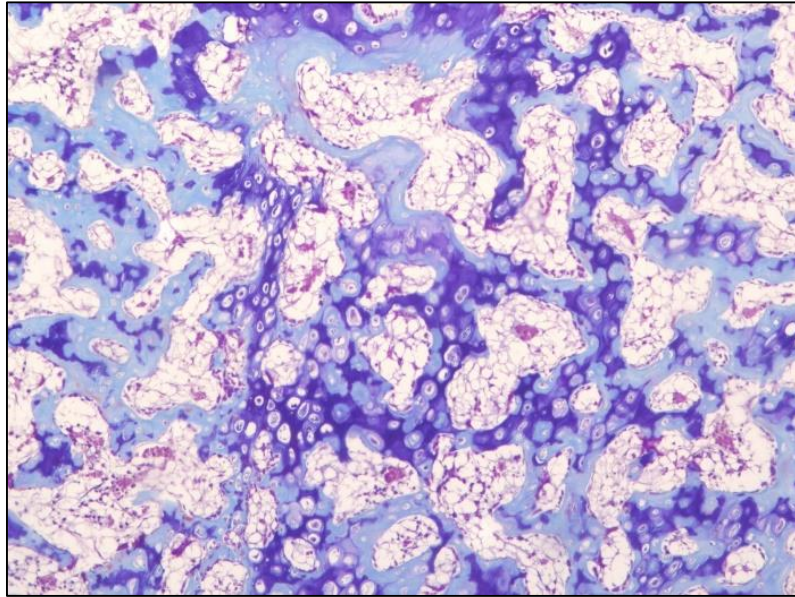


Рисунок 4.43. Участки эхондрального окостенения в просвете костномозгового канала. Окраска по Маллори. X200

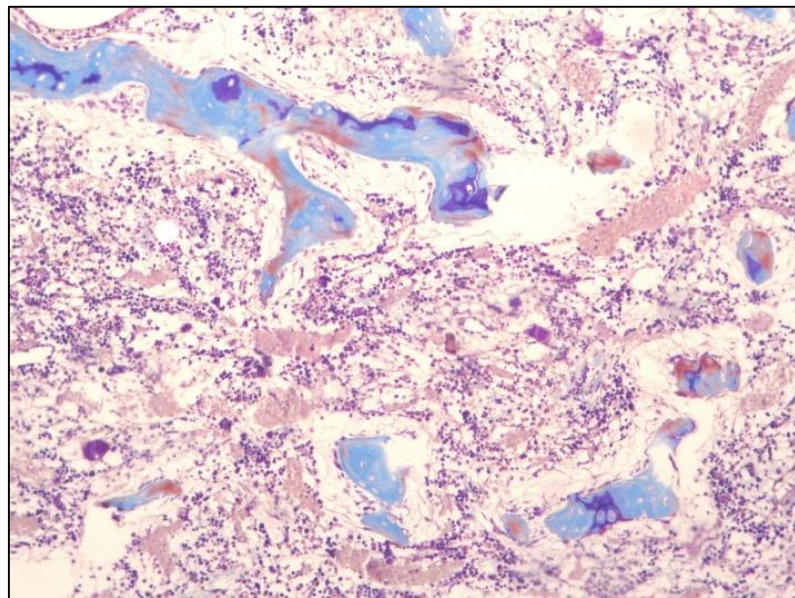


Рисунок 4.44. Фокусы лимфоплазмоцитарной инфильтрации в просвете костномозгового канала. Окраска по Маллори. X100

На 30 сутки в опытной группе костный регенерат был представлен преимущественно костной тканью трабекулярного строения (рисунок 4.45) с кортикальной пластинкой, имеющей признаки трабекуляризации и поднадкостничной регенерации. Костный канал с невыраженным костномозговым пространством был заполнен трабекулярными костными структурами, представленными как пластинчатой, так и ретикулофиброзной

костной тканями. Последнюю окружала соединительная ткань регенеративного типа с выраженными признаками репаративного остеогенеза, который проявлялся в продолжающемся выселении из нее клеток остеобластического ряда и формированием множественных островков первичного остеогенеза. Межтрабекулярное пространство было заполнено ретикулофиброзной костной тканью с большим количеством разнокалиберных кровеносных сосудов.

В центре костного фрагмента определялся очаг хронического воспаления, содержащий инородные тела ячеистой структуры (гидрогель), а также грануляционную, рыхло- и плотноволокнистую ткани, соединительную ткань регенераторного типа, тканевой и клеточный детриты. Все эти мягкие ткани имели слабовыраженную инфильтрацию лимфо- и плазмочитами (рисунок 4.46) и выраженную инфильтрацию макрофагальными клетками (рисунок 4.47). Редко встречались нейтрофильные лейкоциты в единичном количестве.

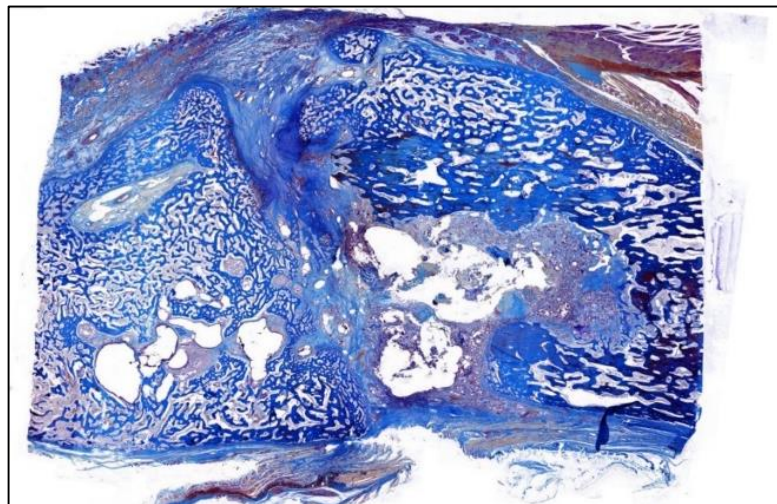


Рисунок 4.45. Гистопантомограмма продольного среза трубчатой кости кролика на 30 сутки после имплантации гидрогеля. Окраска по Маллори.

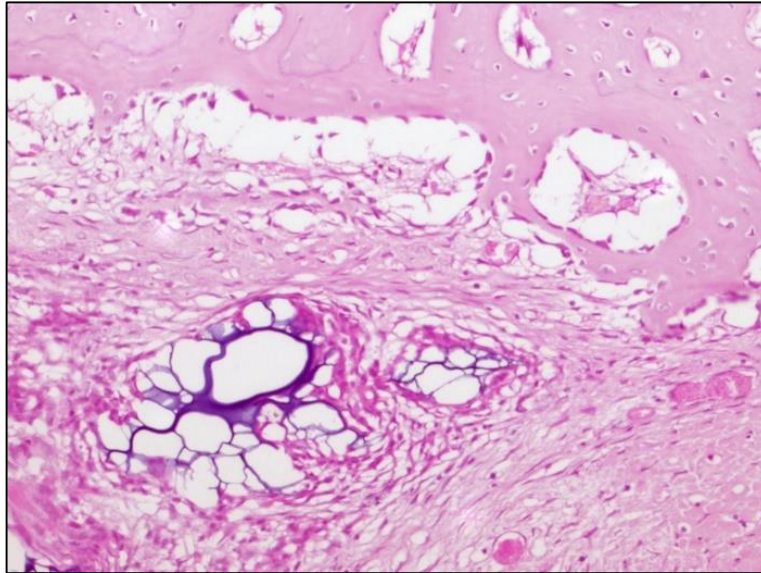


Рисунок 4.46. Фрагмент гистопантограммы продольного среза большеберцовой кости кролика через 30 дней после имплантации гидрогеля. Гигантские клетки резорбируют гидрогель. Слабая инфильтрация клетками лимфоцитарного ряда ретикулярной стромы костного мозга. Окраска гематоксилин и эозин. X200.

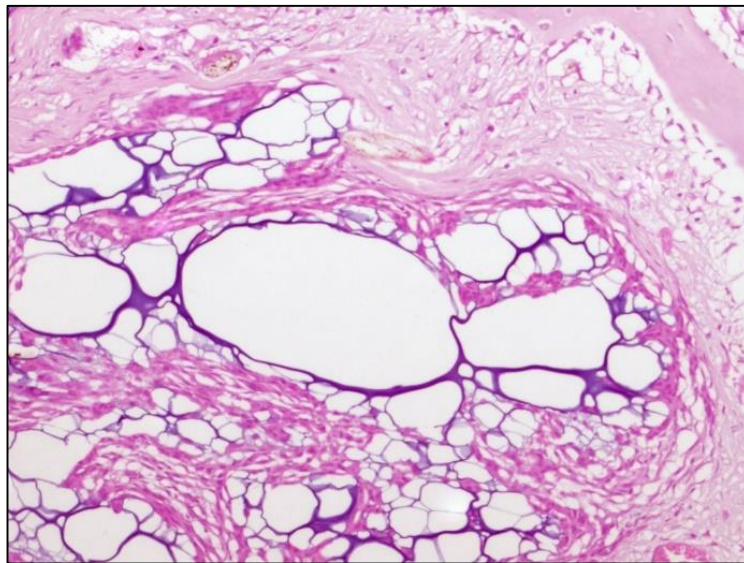


Рисунок 4.47. Фрагмент гистопантограммы продольного среза большеберцовой кости кролика через 30 дней после имплантации гидрогеля. Гигантские клетки резорбируют гидрогель. Окраска гематоксилином и эозином. X200.

Вокруг фрагментов гидрогеля выявляли очаги репаративного остеогенеза без явлений материал-ассоциированной костной резорбции. Новообразованная костная ткань имела обычную структуру с

напластованиями остеоида и активными остеобластами на поверхности. На границе гидрогель-кость также отсутствовала отрицательная реакция со стороны костной ткани (рисунок 4.48). Кроме того, гидрогелевые частицы выявляли и вокруг ретикулофиброзной ткани, расположенной в центральной части костного регенерата.

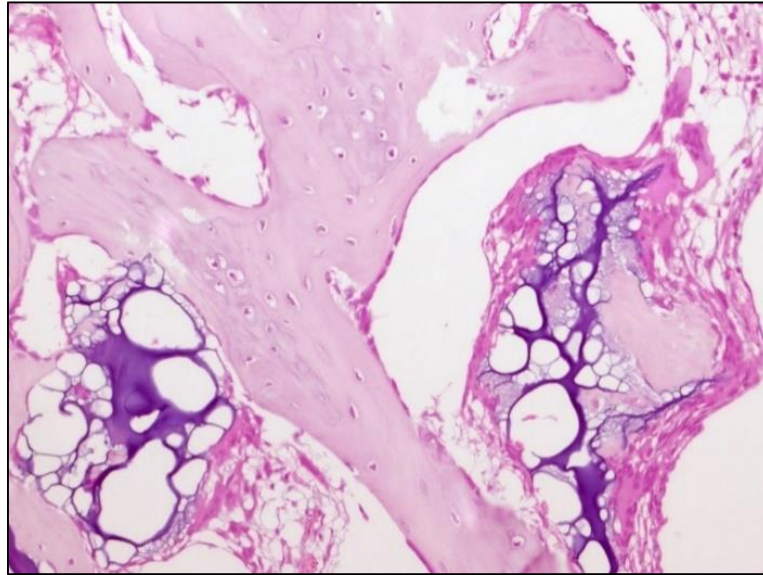


Рисунок 4.48. Фрагмент гистопантограммы продольного среза большеберцовой кости кролика через 30 дней после имплантации гидрогеля. Отсутствие отрицательных реакций со стороны кости на присутствие гидрогеля. Окраска гематоксилин и эозин. X200.

В сравнительной группе гистологически на 30 сутки исследуемая трубчатая кость представляла собой костный регенерат с полями полиметилметакрилатного цемента, который имел вид слоистых образований, напоминающие ровные кристаллические структуры с округлыми контурами (рисунок 4.49).

Поля цемента окружали пластинчатая костная ткань трабекулярного строения и лимфо- и плазмоцитарный воспалительный инфильтрат. В некоторых вариантах инфильтрат включал в себя небольшое число сегментоядерных нейтрофилов. Вокруг гранул костного цемента, порой имеющего вид фрагментирующихся структур (рисунок 4.50), наблюдали материал-ассоциированную резорбцию новообразованной костной ткани.

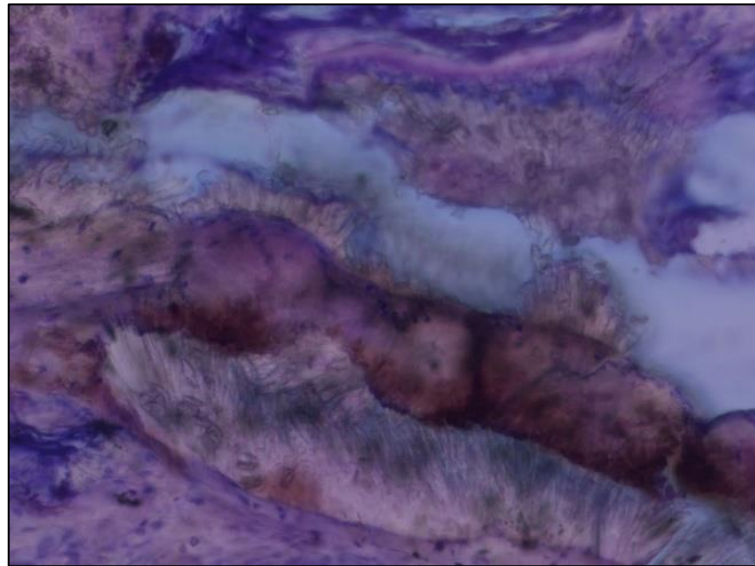


Рисунок 4.49. Гранула костного цемента слоистой структуры в окружении костных балок. Окраска небесный трихром. X200

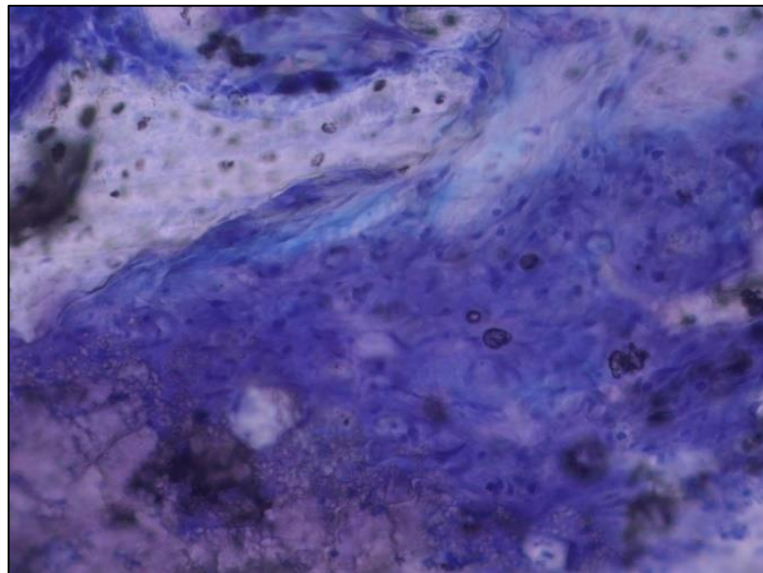


Рисунок 4.50. Гранула костного цемента слоистой структуры с признаками фрагментации в окружении воспалительного инфильтрата. Окраска небесный трихром. X200

Костный регенерат состоял преимущественно из пластинчатой костной ткани с большим числом остеобластов на поверхности костных трабекул. В формирующихся гаверсовых каналах находили отдельные гранулы костного цемента. Довольно часто между гранулами и полями цемента имелась прослойка соединительной ткани регенераторного типа или грануляционной

ткани с инфильтрацией в подавляющем большинстве клетками плазмоцитарного и лимфоцитарного ряда (рисунок 4.51).

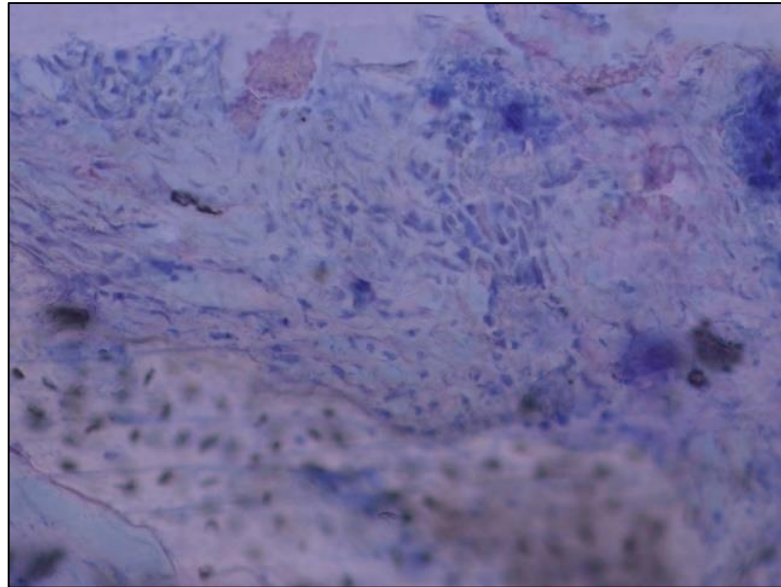


Рисунок 4.51. Пространство между костной трабекулой и костным цементом заполнено соединительной тканью регенераторного типа с воспалительной инфильтрацией. Окраска небесный трихром. X200

В контрольной группе на 30 сутки после хирургической санации исследуемый препарат представлял собой костную мозоль с признаками репаративного остеогенеза. Образцы состояли из двух кортикальных пластинок с очень узкими каналами и формирующимися остеонами, в просвете которых продолжался остеогенез. Одна из кортикальных пластинок имела характерный для трепанобиопсии дефект, заполненный ретикулофиброзной костной тканью с продолжающимся остеогенезом. В суженном просвете костномозгового канала определялись большое количество костных трабекул и фокус кровоизлияний с умеренно выраженной воспалительной инфильтрацией.

В центре самого костного регенерата присутствовали признаки энхондрального окостенения (рисунок 4.52), то есть происходил процесс замещения полей хондроиды ретикулофиброзной костной тканью (рисунок 4.53). При этом, пластинчатое костное вещество в регенерате определялось в меньшей степени.

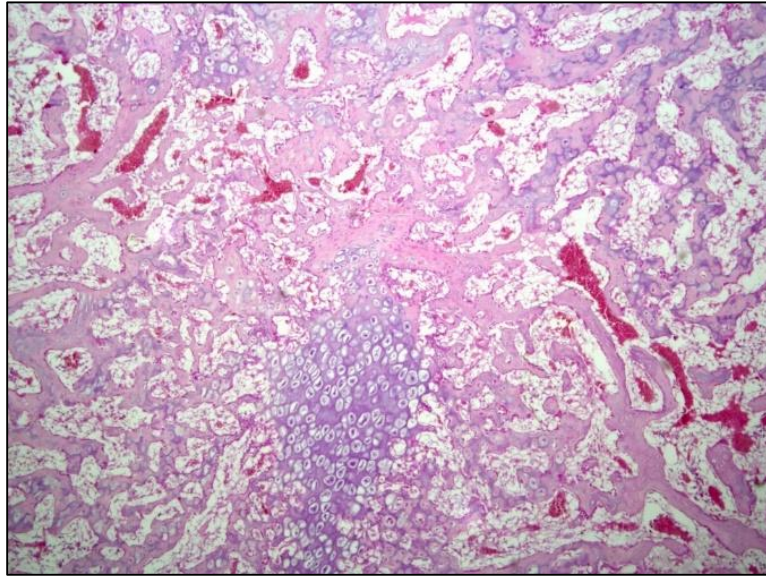


Рисунок 4.52. Фрагмент костного регенерата в контрольной группе на 30 сутки после хирургической санации. Участок энхондрального окостенения. Окраска гематоксилин и эозин. X50

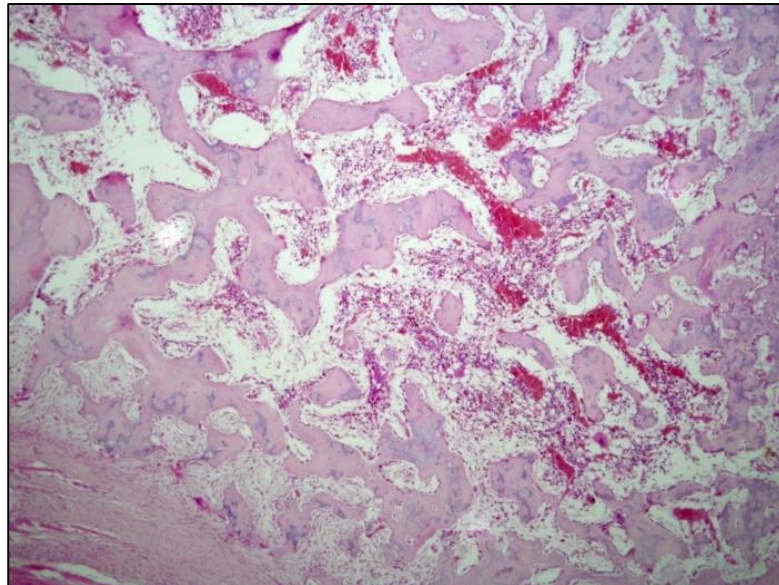


Рисунок 4.53. Фрагмент костного регенерата в контрольной группе на 30 сутки после хирургической санации. Участок энхондрального окостенения. Замещение хондроида ретикулофиброзной костной тканью. Окраска гематоксилин и эозин. X50

Пространство между трабекулами и островками новоформирующейся костной ткани включало очаговые скопления лимфоцитов и плазмоцитов с полнокровными сосудами. Заметно выделялись участки множественных кровоизлияний. Ретикулярная строма костного мозга и соединительная ткань

регенеративного типа, заполняющие межтрабекулярное пространство и просвет формирующихся гаверсовых каналов, содержали в себе значительные очаги лимфо- и плазмоцитарного воспалительного инфильтрата (рисунки 4.54 и 4.55).

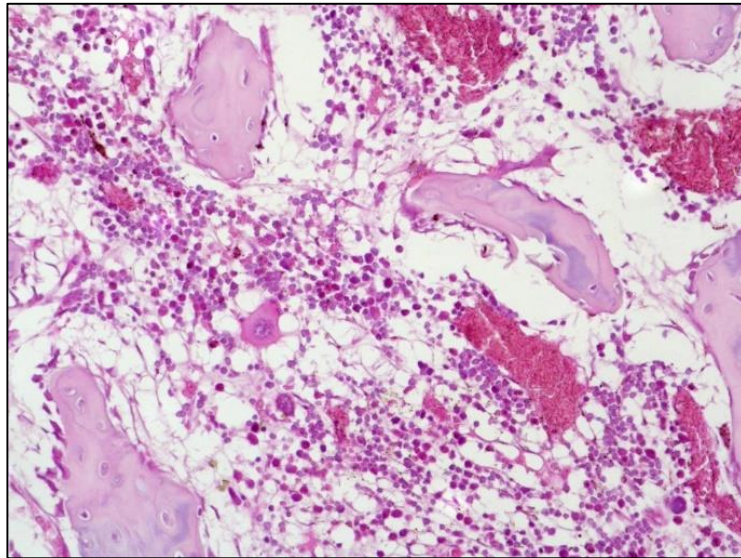


Рисунок 4.54. Воспалительный инфильтрат в ретикулярной строме костной мозги, представленный лимфоцитами и плазмоцитами. Окраска гематоксилин и эозин. X100

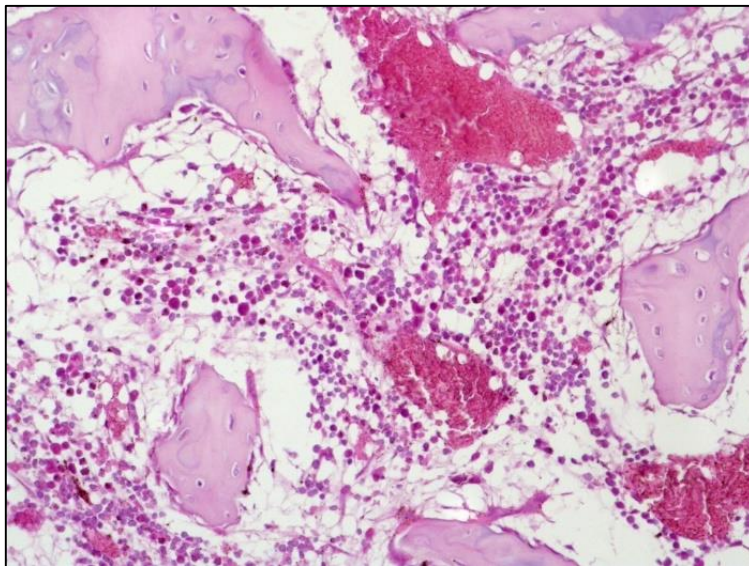


Рисунок 4.55. Воспалительный инфильтрат в ретикулярной строме костного мозги, представленный лимфоцитами и плазмоцитами. Окраска гематоксилин и эозин. X100

На 45 сутки в опытной группе исследуемый материал являл собой костный регенерат, состоящий преимущественно из костной ткани трабекулярного строения. Кортикальная пластинка обнаруживала в себе признаки трабекуляризации и поднадкостничной регенерации. Просвет костномозгового канала содержал умеренное количество трабекул губчатой кости, которая была представлена пластинчатой и ретикулофиброзной костными тканями (рисунок 4.56). Последняя окружена соединительной тканью регенеративного типа, частично дифференцировавшейся в жировую ткань желтого костного мозга. Межтрабекулярное пространство в основе своей заполнено ретикулярной костномозговой стромой с множественными кровеносными сосудами различного диаметра.

Инородные тела ячеистой структуры (гидрогель) были расположены в центре костного фрагмента. Помимо всего здесь имелись грануляционная, рыхло- и плотноволокнистая ткани, соединительная ткань регенераторного типа, тканевой и клеточный детриты. Воспалительная инфильтрация вышеописанных тканей была представлена немногочисленными плазмócитами и клетками макрофагального ряда (рисунок 4.57).

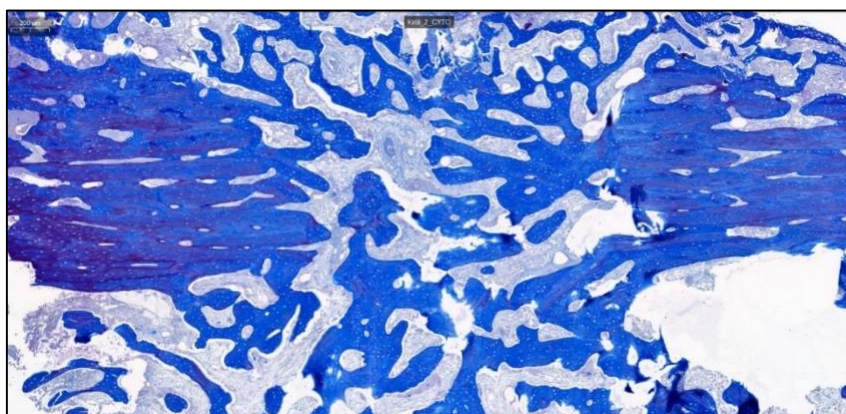


Рисунок 4.56. Гистопантограмма продольного среза губчатой кости кролика. Окраска по Маллори.

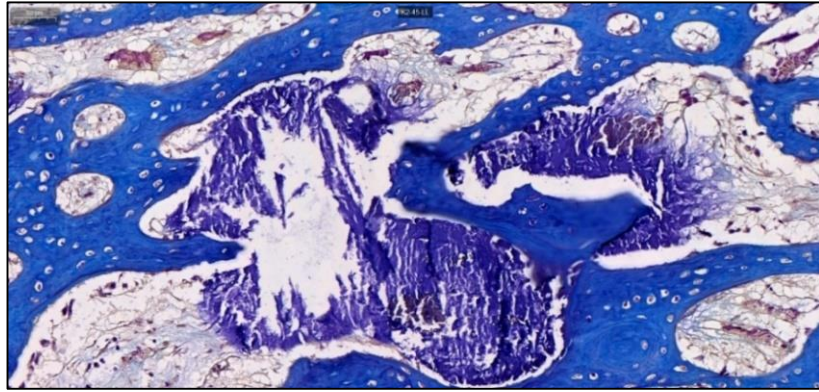


Рисунок 4.57. Фрагмент гистопантограммы продольного среза трубчатой кости кролика. Признаки резорбции гигантскими клетками инородного тела (гидрогеля). Окраска по Маллори.

На текущий срок по гистологической картине репаративный остеогенез стихает, его сменяет резорбция новообразованной костной ткани, как этап ремоделирования. Часть гидрогеля сохраняется в просветах гаверсовых каналов, сформировавшихся в результате репаративного остеогенеза в присутствии имплантированной гидрогелевой матрицы (рисунки 4.58 и 4.59).

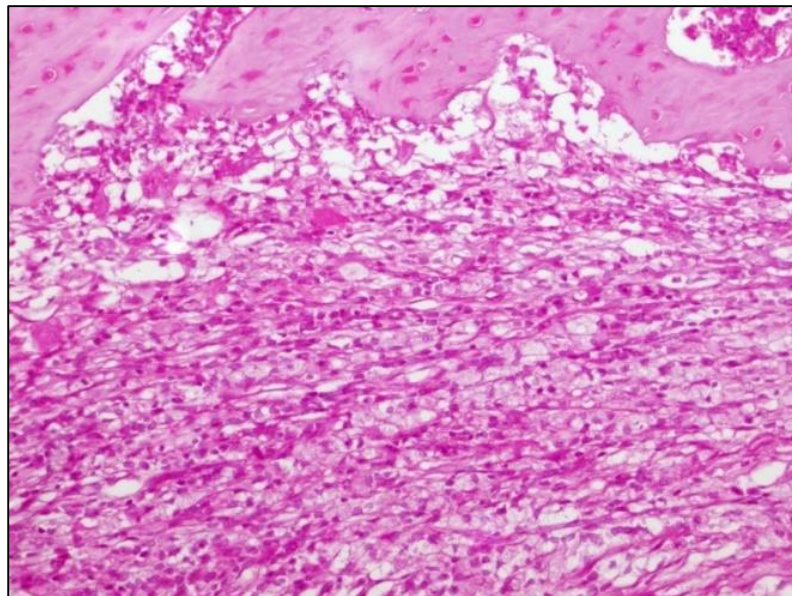


Рисунок 4.58. Фрагмент гистопантограммы продольного среза трубчатой кости кролика. Грануляционная ткань и соединительная ткань регенераторного типа рядом с областью имплантации гидрогеля. Среди клеток фибробластического ряда единичные плазмоциты и макрофаги.

Окраска гематоксилином и эозином. X100

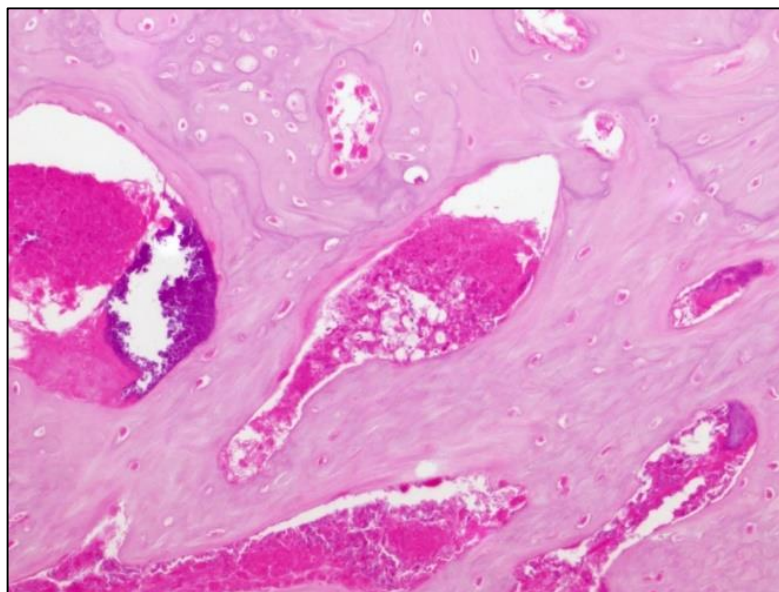


Рисунок 4.59. Фрагмент гистопантограммы продольного среза большеберцовой кости кролика через 45 дней после имплантации гидрогеля. Гигантские клетки резорбируют гидрогель внутри просвета гаверсовых каналов. Окраска гематоксилином и эозином. X200

Продольные костные шлифы большеберцовой кости кроликов через 45 суток после имплантации костного цемента представляли собой трубчатую кость с костным регенератом и полями костного цемента. Последний являл собой слоистые образования по типу кристаллических структур. Между полями и отдельными гранулами цемента имелись обширные участки соединительной ткани регенераторного типа, фиброзной и грануляционной ткани выражено инфильтрированных полиморфноядерными нейтрофилами (рисунок 4.60). При этом, воспалительный инфильтрат занимал почти весь объем костномозгового канала.

Трабекулы новообразованной костной ткани в большей части резорбировались остеокластами (рисунок 4.61). Признаков остеогенеза на поверхности узурированных клеток не отмечалось. Резорбция костной ткани была особенно выраженной на границе с воспалительным инфильтратом (рисунок 4.62).

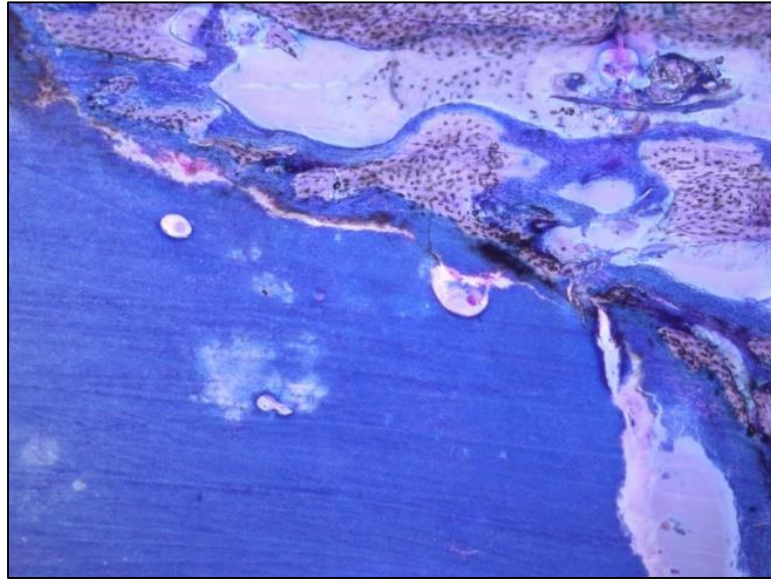


Рисунок 4.60. Поля воспалительного инфильтрата в костномозговом пространстве. Микроабсцесс. Окраска небесный трихром. X50

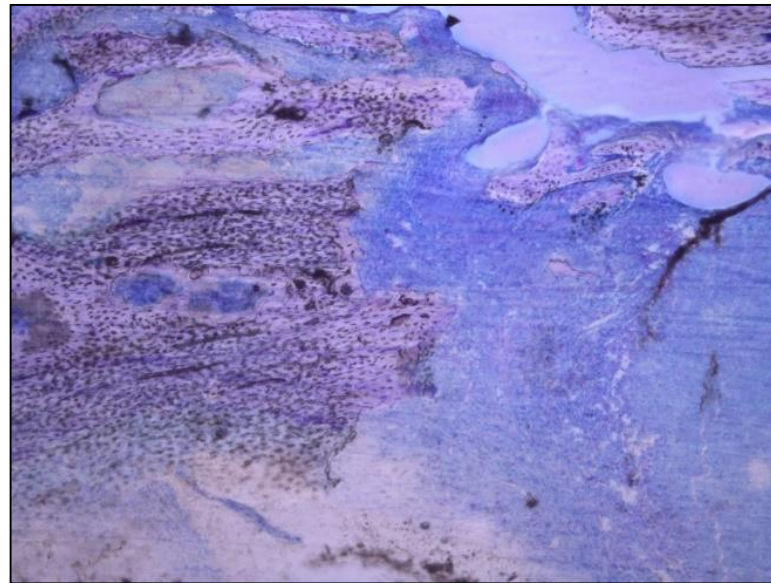


Рисунок 4.61. Резорбция костного вещества на границе с воспалительным инфильтратом. Окраска небесный трихром. X100

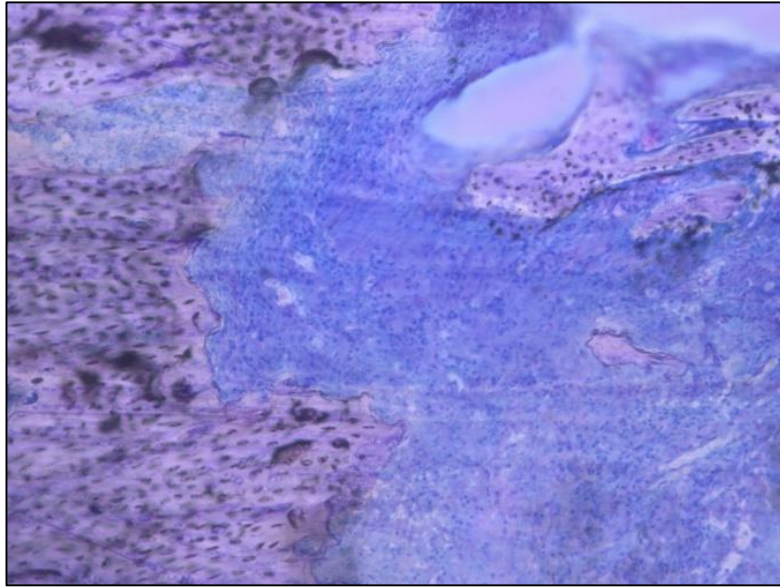


Рисунок 4.62. Резорбция костного вещества на границе с воспалительным инфильтратом. Окраска небесный трихром. X200

Большую часть площади воспалительного инфильтрата занимали клетки лимфоплазмочитарного ряда (рисунок 4.63). В отдельных случаях встречались нейтрофильные лейкоциты, иногда формирующие поля по типу микроабсцессов.

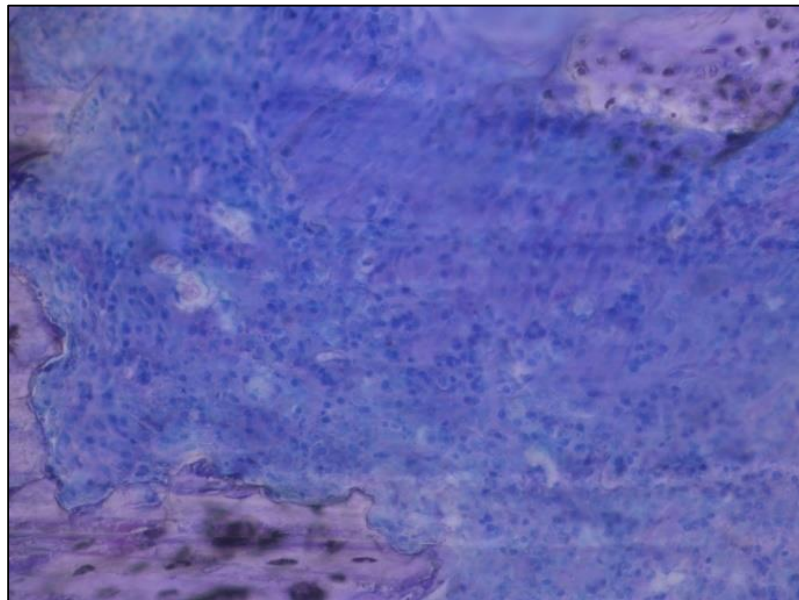


Рисунок 4.63. Воспалительный инфильтрат, представленный полиморфноядерными лейкоцитами в соединительной ткани регенераторного типа. Окраска небесный трихром. X200

Гистологическая картина препаратов кролика из контрольной группы на 45 сутки практически идентична результатам 30 суток, за исключением того, что фокус кровоизлияния с умеренной инфильтрацией наблюдался не только в просвете суженного костномозгового канала, но и непосредственно в кортикальной пластинке (рисунки 4.64 и 4.65). Каналы Гаверса и межбалочное пространство также были заполнены ретикулофиброзной костной тканью и соединительной тканью регенеративного типа с очагами лимфоплазмозитарного воспалительного инфильтрата. К данным суткам отмечалась высокая компактизация костного вещества в кортикальной стенке (рисунок 4.66). Значительный массив параоссальной костной мозоли образовывался за счет продолжающейся периостальной реакции. При этом, костная ткань в мозоли в кортикальной стенке имела губчатое строение и содержала большое количество ретикулофиброзной костной ткани с явлениями репаративного остеогенеза. В ней же наблюдали фокус кровоизлияния (рисунок 4.67).

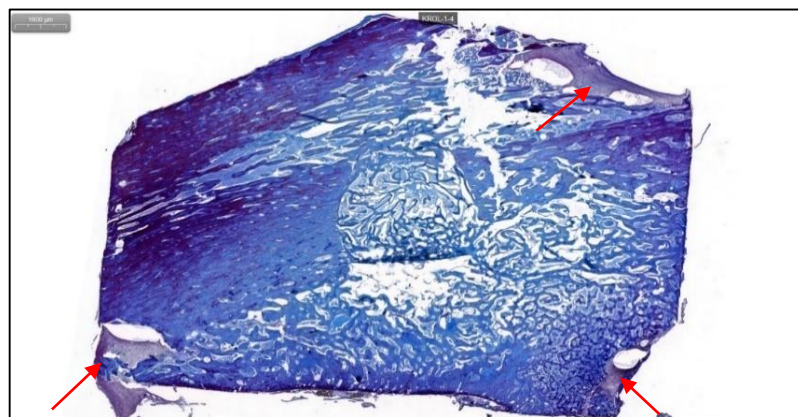


Рисунок 4.64. Препарат поперечного среза диафиза трубчатой кости кролика.

Микроскопическая картина костной мозоли с фокусами кровоизлияний
(указаны стрелками). Окраска по Маллори

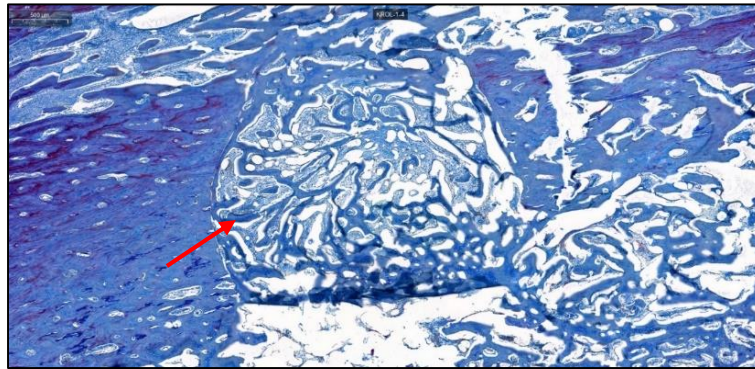


Рисунок 4.65. Дефект кортикальной пластинки после трепанобиопсии, заполненный ретикулофиброзной костной тканью (указан стрелкой).

Окраска по Маллори.

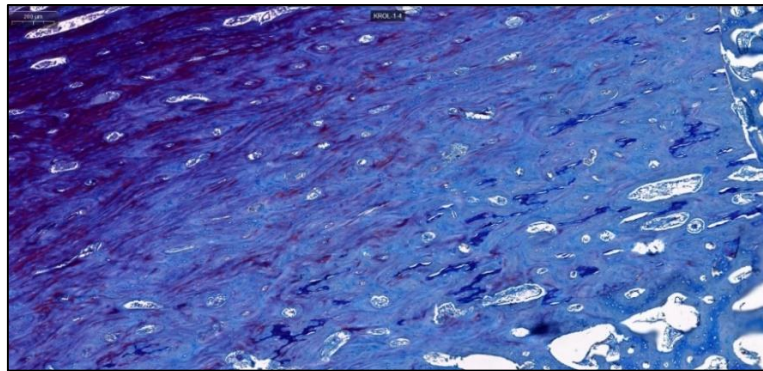


Рисунок 4.66. Высокая компактизация костного вещества в кортикальной пластинке. Окраска по Маллори

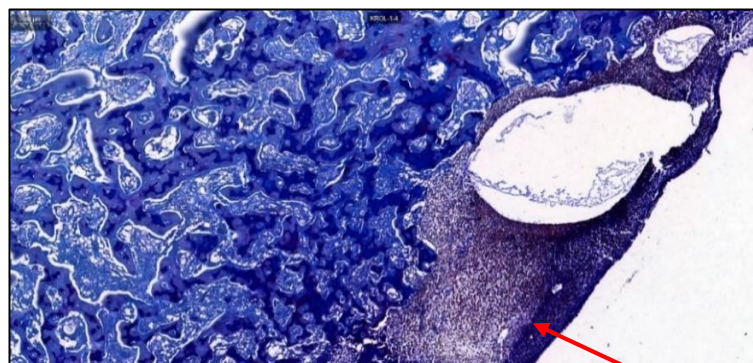


Рисунок 4.67. Фокус кровоизлияния в периостальной костной мозоли (указан стрелкой). Окраска по Маллори

4.2.6. Результаты морфометрического исследования

Морфометрическое исследование препаратов большеберцовой кости кроликов показало, что у подавляющего большинства животных признаки острого остеомиелита отсутствовали ($A1+A2=0$), в то время как признаки

хронического остеомиелита преобладали ($C1=2, C2=2; C1+C2=4$). Иногда выявляли незначительное количество нейтрофилов в составе регенерата ($A3=1$). Так в группе кроликов с имплантированным гидрогелем на 15 сутки после санации отмечали слабую степень острой фазы остеомиелита ($A3=1; A1+A2+A3=1$) на фоне преобладания явлений хронического остеомиелита ($C1=1, C2=3; C1+C2=4$). На 30 сутки признаки острой фазы не обнаружены ($A1+A2+A3=0$), также наблюдалась тенденция к снижению проявлений хронического воспаления до минимальных значений ($C1=1, C2=1; C1+C2=2$), что по шкале HOES соответствует слабовыраженной хронической форме остеомиелита. Сходные значения в группе были получены и на 45 сутки исследования ($A1+A2+A3=0; C1=1, C2=1; C1+C2=2$). Выявленный остаточный уровень лимфоплазмочитарной и макрофагальной инфильтрации к концу исследования может быть обусловлен реакцией на присутствие инородного тела в виде гидрогеля, которая в последующем нивелируется после полной резорбции имплантированной матрицы.

В группе кроликов с имплантированным костным цементом на 15 сутки после санации имелись явные признаки острой фазы остеомиелита ($A1=0, A2=0, A3=2; A1+A2+A3=2$) на фоне умеренно выраженных явлений хронического воспаления ($C1=2, C2=3; C1+C2=5$). К 30 суткам степень проявления острой фазы ослабла ($A3=1; A1+A2+A3=1$), однако прогрессировали признаки хронической фазы ($C1=3, C2=3; C1+C2=6$), соответствующие, согласно шкале HOES, выраженной форме хронического остеомиелита. На 45 сутки зафиксированы явления как острой ($A1=0, A2=0, A3=2; A1+A2+A3=2$), так и выраженной хронической формы остеомиелита ($C1=3, C2=3; C1+C2=6$). Обострение инфекционного процесса до острой фазы к данному сроку вероятно связано с реакцией организма на введение цемента и прекращением или высвобождением субингибирующих концентраций антибиотика из объема матрицы, что не исключает формирование на его поверхности бактериальной биопленки.

В случае контрольной группы активность остеогенеза ($A_1+A_2+A_3=0$) и степень выраженности признаков хронического остеомиелита ($C_1=2, C_2=2; C_1+C_2=4$) сохранялись неизменными на всех сроках наблюдения.

Проведенный попарный анализ полученных данных, представленный на рисунках 4.68-4.70, выявил существенные различия во внутригрупповых и межгрупповых показателях активности остеомиелита. Так в опытной группе активность хронического остеомиелита значимо ($p=0,002$) снизилась с уровня $A_{1-3}=1, C_{1-2}=4$ до уровня $A_{1-3}=0, C_{1-2}=2$, что существенно отличается от результатов сравнительной и контрольной групп, начиная с 30 суток исследования.

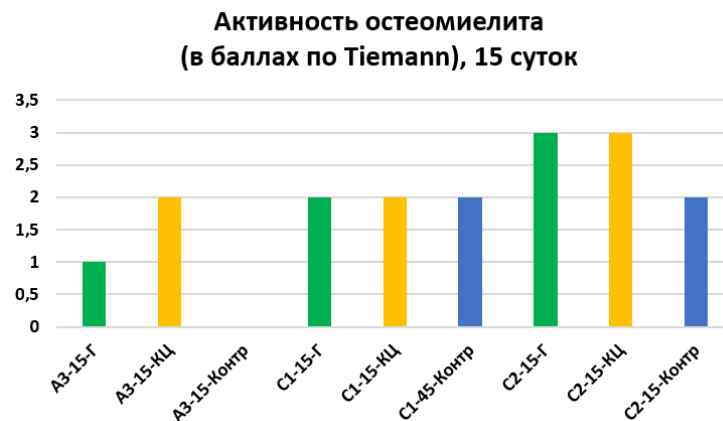


Рисунок 4.68. Межгрупповые данные активности остеомиелита через 15 дней после хирургической санации (Г - гидрогель, КЦ - костный цемент, Контр - контроль).

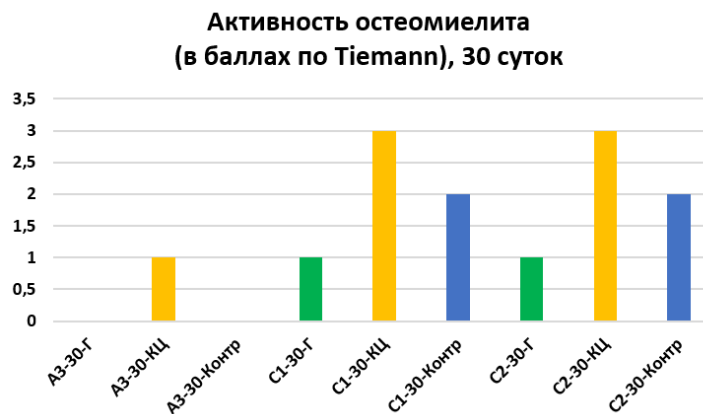


Рисунок 4.69. Межгрупповые данные активности остеомиелита через 30 дней после хирургической санации (Г - гидрогель, КЦ - костный цемент, Контр - контроль)

При сопоставлении морфометрических данных в сравнительной группе до хирургической санации ($A_{1-3}=0$, $C_{1-2}=4$) и на 15 сутки после имплантации костного цемента ($A_{1-3}=2$, $C_{1-2}=5$) отмечалась картина активации явлений остеомиелита через обострение ($p=0,01$). К 30 суткам острая фаза шла на спад ($A_{1-3}=1$), но при этом нарастала фаза продуктивного воспаления ($C_{1-2}=6$) ($p=0,001$). К концу исследования при сохранности степени выраженности хронической формы ($C_{1-2}=6$) наблюдался рост проявлений острой до $A_{1-3}=2$ ($p=0,001$), что указывает на рецидив хронического остеомиелита большеберцовой кости.

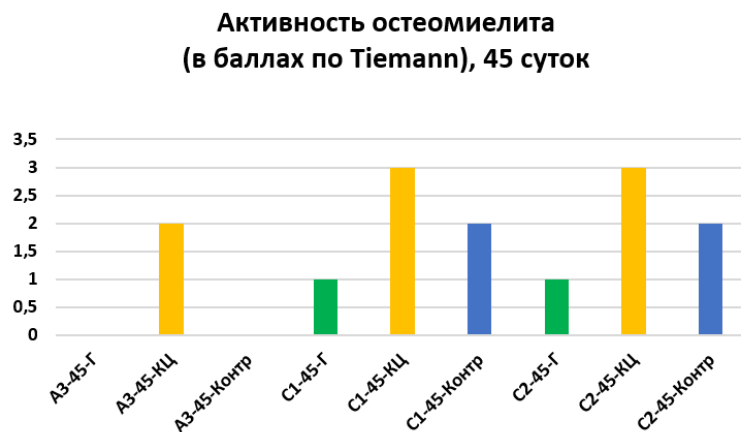


Рисунок 4.70. Межгрупповые данные активности остеомиелита через 45 дней после хирургической санации (Г - гидрогель, КЦ - костный цемент, Контр - контроль)

4.3. Резюме по результатам in vivo исследования

Проведенный in vivo эксперимент на модели кроликов, подтвердил результаты 1 и 2 этапов исследования. Во всех случаях при имплантации гидрогеля клинически наблюдалось своевременное заживление послеоперационной раны. При этом только в 1 (9,1 %) случае потребовалась 3-дневная системная антибактериальная терапия, и то в целях профилактики

присоединения вторичной инфекции после выполненного открытого остеосинтеза травмированной большеберцовой кости. В сравнительной группе, напротив, локальная терапия потребовала дополнительного системного антибактериального лечения у 6 (54,5 %) животных, начиная с 7 суток исследования. С 21 суток дозировка вводимого препарата была увеличена до 40 мг/кг в 3 (27,3 %) наблюдениях, ввиду отсутствия положительной динамики регрессии клинических симптомов инфекционно-воспалительного процесса. Однако, несмотря на усиленную вспомогательную терапию, у 1 (9,1 %) кролика с имплантированным костным цементом к концу исследования не удалось добиться полного заживления раны, и такой же процент животных к указанному сроку имел минимальный воспалительный признак в виде остаточного инфильтрата в области послеоперационного рубца. В контрольной группе, несмотря на полное рубцевание раны, которое в 1 из 3 случаев достигнуто к 28 суткам, системное антибактериальное лечение без локальной терапии в нашем исследовании оказалось неэффективным. Поскольку на всех сроках наблюдения в группе без имплантации материала отмечались клинические признаки воспаления.

Достоверное различие в весе тела животных в опытной группе с 28 суток ($p=0,006$) в отличие от сравнительной группы (таблица 7), также косвенно указывает на быстрое восстановление общего состояния кроликов в группе с имплантированным гидрогелем в послеоперационном периоде.

В лабораторных показателях крови первые межгрупповые различия наметились только к 14 суткам в случае WBC и к 21 суткам в случае СРБ. До этих сроков во всех изучаемых группах уровень данных маркеров воспаления колебался и не имел определенной динамики. Как видно из таблицы 9, уровень лейкоцитов через 2 недели после имплантации значительно снизился в опытной группе ($p=0,040$) и сохранялась эта достоверность практически до конца исследования. Так, к 42 суткам наблюдения значение p для WBC в опытной группе составило $0,011$. Относительно СРБ первая существенная разница в результатах опытной группы в сравнении с другими группами обнаружена

через 3 недели после санации ($p=0,040$), однако окончательная стойкая достоверная разница определилась только с 35 суток исследования ($p=0,011$). В сравнительной группе у 27,3 % ($n=3$) кроликов к концу исследования уровень WBC был выше $8 \times 10^9/\text{л}$, а уровень СРБ составил более 10 мг/л. Несмотря на это, в группе животных с имплантированным костным цементом в целом наблюдалось снижение уровня лейкоцитов и СРБ, однако оно не было столь эффективным как в группе кроликов с имплантированным гидрогелем. К примеру, на 21 сутки после санации уровень С-реактивного белка в сравнительной группе составил $18,3 \pm 8,1$ мг/л против $12,5 \pm 12,6$ мг/л - в опытной группе. К 42 суткам данный показатель составил $11,8 \pm 9,4$ мг/л и $2,7 \pm 4,1$ мг/л соответственно (таблица 8). В контрольной группе после некоторого снижения значений WBC и СРБ отмечено резкое 2-кратное повышение их уровней к концу исследования, что соответствует клинической картине обострения хронического остеомиелита.

СОЭ у кроликов, согласно полученным нами результатам, не является маркером воспаления, по которому можно было бы судить об эффективности проводимого лечения, поскольку уровни его практически не отличались у животных со стойкой ремиссией и продолжающимся воспалением или рецидивом хронического инфекционно-воспалительного процесса.

Уровень Hb, несмотря на его быстрое восстановление после санации в группе животных с имплантированным полимерным гидрогелем по сравнению с остальными группами, существенных отличий не имел.

Как выяснилось из выполненного нами анализа, не стоит рассматривать результаты лабораторных показателей крови в качестве эффективной оценки проводимого лечения в ранние сроки наблюдения, поскольку уровни их могут колебаться без определенной динамики в течение практически первых 2-3 недель после хирургической санации. Foster et al. и вовсе считают, что маркеры воспаления у животных, на примере овец, не являются надежными показателями эффективности подавления инфекционно-воспалительного процесса [112]. Хотя в нашем исследовании получены достоверные

межгрупповые отличия в уровнях маркеров воспаления, показатели лабораторного исследования следует интерпретировать в совокупности с результатами клинического, микробиологического, рентгенологического и гистологического исследований.

Рентгенографический анализ показал, что в подавляющем большинстве случаев в сравнительной группе, вне зависимости от того была ли инфекция успешно купирована или нет, на всех контрольных сроках отмечались признаки продолжающегося хронического остеомиелита большеберцовой кости в виде периостальных наслоений с формированием поднадкостничных кистозных полостей, неоднородной структуры костной ткани с распространением в некоторых случаях зоны остеосклероза до средней трети кости, а также секвестрацией и замедленной остеорепарацией. Так, к примеру, у кролика с положительной динамикой вторичного заживления раны, достигнутой за счет усиленной системной антибактериальной терапии, прогрессирование периостита привело к формированию массивного костного нароста, ставшего причиной повторного расхождения краев раны с оголением кости. Более того, уже с 15 суток и до конца исследования рентгенологически прослеживалась зона резорбции на границе «кость-цемент».

В контрольной группе в целом наблюдалась аналогичная с группой сравнения рентгенологическая картина. Отличием являлись степень выраженности периостита и остеосклерозирования, распространившегося на всю толщу костной ткани с захватом большей площади нижерасположенных сегментов большеберцовой кости.

В опытной группе, напротив, явной периостальной реакции, остеопороза или фрагментации проксимального отдела большеберцовой кости на рентгенограммах не наблюдалось, замещение дефектов протекало равномерно и к концу исследования посттравматические отверстия практически полностью закрылись. Кроме того, имплантация гидрогеля не продемонстрировала неблагоприятного влияния на процесс и срок сращения перелома большеберцовой кости (рисунок 4.28) и, в отличие от животного из

контрольной группы с такой же травмой (рисунок 4.30), не усугубило исходные признаки хронического остеомиелита с течением времени.

Микробиологический анализ раневого отделяемого в опытной группе не показал роста микрофлоры. Отрицательные результаты получены и при бактериологическом исследовании биоптатов поэтапно выведенных животных. Полученный единичный положительный бактериальный посев мягкотканого биоптата, изъятый из голени кролика со сросшимся переломом большеберцовой кости на 30 сутки после имплантации гидрогеля, достаточно сомнителен. Поскольку ни на самом гидрогеле, взятого из костномозгового канала и с поверхности мягких тканей, ни в костной ткани и других участках мягкотканых структур, в том числе в исследованиях удаленных спиц и мазка области всего оперативного вмешательства, данный микроб не идентифицирован. Вероятнее всего, контаминация образца произошла вследствие нарушения техники забора материала или его транспортировки. В группе кроликов с имплантированным костным цементом рост культуры *MSSA* идентифицировался на каждом контрольном сроке как из раневого отделяемого (до 45,5 %), так и из образцов материалов животных, выведенных на 15 сутки (9,1 %) и 45 сутки (27,3 %), за исключением 30 суток. Стоит отметить, что в 9,1 % случаев к концу исследования рост на костном цементе получен у кролика со стойкой ремиссией инфекции. К этому предрасполагает гидрофобная поверхность небиodeградируемого ПММА, вследствие которого в последующем развивается рецидив инфекции и приобретает резистентность микроорганизмами к загруженному в цемент антибиотику.

В контрольной группе *MSSA* верифицировался у всех животных пока присутствовало раневое отделяемое. Положительный результат также был получен из биоптатов кролика, выведенного на 15 сутки исследования. Несмотря на то, что нам не удалось получить материал из костномозгового канала большеберцовой кости животных, выведенных на 30 и 45 сутки наблюдения, имевшаяся макроскопическая картина (булавовидное утолщение поперечника проксимального сегмента кости с неровными контурами,

перекрытие областей дефекта массивными периостальными наслоениями с выраженным остеосклерозом более половины длины кости) указывала на продолжающийся инфекционно-воспалительный процесс на момент вывода кроликов из эксперимента. Однако даже при наличии явных признаков инфекции и материала для исследования, не всегда обнаруживается положительный рост культуры, что подтверждается полученным нами на 45 сутки отрицательным результатом бактериологического исследования гнойного детрита, взятого из области, соответствующей проекции инфильтрата.

Как показал анализ гистоморфометрического исследования в обеих группах на 15 сутки после имплантации полимерного гидрогеля и костного цемента соответственно наблюдались признаки репаративного остеогенеза на фоне различной степени выраженности воспаления (рисунок 4.68). Если в опытной группе ретикулярная строма костного мозга обнаруживала в себе слабые признаки инфильтрации лимфоцитами и содержала большое количество клеток макрофагального ряда (рисунок 4.37), то в сравнительной группе очаг воспаления занимал обширные поля ($A1+A2+A3=2$; $C1+C2=5$), выражено инфильтрированных большим количеством лимфоцитов и плазмоцитов (рисунок 4.40). Более того, пространство между отслоившимися полями цемента также было заполнено воспалительным инфильтратом. Собственно репаративный остеогенез в сравнительной группе был менее выраженным и содержал меньший объем ретикулофиброзной костной ткани. В опытной группе, напротив, наблюдались признаки активной репарации костной ткани в виде эндостальной и периостальной реакций с формированием ретикулофиброзной костной ткани с трабекуляризацией на кортикальной стенке, где имелись посттравматические отверстия. Наличие последней определялось и в самом костномозговом канале. Гидрогель к указанному сроку занимал обширную площадь, которая была окружена гигантскими резорбирующими его клетками и множественными очагами

первичного остеогенеза, что говорит об отсутствии какого-либо токсического эффекта со стороны гидрогелевого материала.

На 30 сутки исследуемые группы по-прежнему значимо отличались степенью выраженности воспаления в костной ткани (рисунок 4.69). В опытной группе процесс остеорепарации продолжался на фоне достоверно ($p=0,002$) затихающего воспаления. Резорбируемые гигантскими клетками фрагменты гидрогеля обнаруживались как в очаге слабовыраженного воспалительного инфильтрата, так и в новообразованной костной ткани. При этом, отрицательной реакции в виде материал-ассоциированной костной резорбции со стороны костной ткани на присутствие инородного гидрогелевого материала не обнаружено. Новообразованная костная ткань имела обычную структуру с напластованиями остеоида и активными остеобластами на поверхности.

В случае перелома большеберцовой кости в опытной группе гистологически каких-либо нарушений процесса сращения не наблюдали. В просвете костномозгового канала обнаруживали трабекулярную пластинчатую и ретикулофиброзную костные ткани с формированием множественных очагов первичного остеогенеза. Межтрабекулярное пространство содержало ретикулофиброзную костную ткань с большим количеством разнокалиберных кровеносных сосудов.

В то же время в сравнительной группе, несмотря на стойкую клинико-лабораторную ремиссию инфекции к указанному сроку, гистологически не наблюдалось положительной динамики в течении репаративного остеогенеза и подавлении воспалительного процесса. Напротив, морфометрически отмечено достоверное ($p=0,001$) нарастание фазы продуктивного воспаления ($C_{1-2}=6$), которая проявилась материал-ассоциированной резорбцией новообразованной костной ткани, особенно выраженной на границе «кость-цемент» (рисунок 4.49), и сохранением очагов выраженного лимфоплазмочитарного инфильтрата как вокруг самого имплантата, так и между его гранулами и полями (рисунки 4.50 и 4.51).

К концу исследования (45 сутки) у животных опытной группы отмечено ремоделирование новообразованной костной ткани и дифференцировка ретикулофиброзной костной ткани в жировую ткань желтого костного мозга. Инфекционно-воспалительный процесс к этому моменту практически полностью стих, что подтверждается данными морфометрического анализа ($p=0,002$). Так, площадь воспалительного инфильтрата к данному сроку существенно сократилась по сравнению с 15 сутками (рисунки 4.35 и 4.59) и содержала в себе немногочисленные плазмоциты и клетки макрофагального ряда. Обнаруживаемые остаточные частицы гидрогеля в очаге небольшого воспаления и в просветах сформированных гаверсовых каналов все еще продолжали резорбироваться гигантскими клетками. Одновременно с этим в группе кроликов с имплантированным ПММА наблюдали достоверные ($p=0,001$) признаки обострения инфекционно-воспалительного процесса, которые проявились усугублением резорбции новообразованной костной ткани более заметной на границе с воспалительным инфильтратом (рисунок 4.61). Признаков ремоделирования костной ткани как у животных с полимерным гидрогелем не наблюдалось. Очаг воспаления, характеризующийся выраженной инфильтрацией полиморфноядерными нейтрофилами с формированием микроабсцессов, увеличился в такой мере, что заполнил пространство не только вокруг и между полями цемента, но и почти всего костномозгового канала (рисунок 4.60). Такая гистоморфометрическая картина говорит об отсутствии антибактериального эффекта со стороны имплантированного костного цемента вследствие прекращения высвобождения антибиотиков либо элюции им субингибирующих концентраций препарата.

В случае контрольной группы гистологическая оценка не показала улучшений после хирургической санации и системной антибактериальной терапии ни на одном из контрольных периодов наблюдения. Для всех сроков морфометрические результаты были неизменными - $A1+A2+A3=0$; $C1+C2=4$. Очаги умеренно выраженной воспалительной инфильтрации на 45 сутки

соответствовали исходным данным на 21 сутки инфицирования. Разница заключалась лишь в высокой степени компактизации костного вещества кортикальной стенки (рисунок 4.66) с продолжающейся периостальной реакцией и в обнаружении множественных фокусов кровоизлияний (рисунок 4.64), которые к концу исследования выявляли не только в просвете суженного костномозгового канала, но и в кортикальной пластинке. Консолидация перелома большеберцовой кости в контрольной группе протекала с некоторым замедлением, на что указывают признаки наличия хонроида к 30 суткам исследования.

Полученные гистологические данные в контрольной группе, где проводилась только системная антибиотикотерапия без местной, несколько лучше по сравнению с группой ПММА. Однако, учитывая клинико-лабораторные результаты в контрольной группе на 42 сутки, вероятнее всего, с течением некоторого времени мы бы получили идентичную костному цементу гистоморфометрическую картину хронического остеомиелита.

В целом, гистоморфометрическое исследование показало существенные отличия во всех трех группах и подтвердило данные рентгенологического анализа. Группа кроликов с имплантированным гидрогелем в сравнении с остальными группами характеризовалась эффективным постепенным подавлением воспалительного процесса без нарушения репаративного остеогенеза, сроков консолидации перелома и не вызывала каких-либо токсических и отрицательных реакций в костной ткани. Объем имплантированного гидрогелевого материала с каждым контрольным сроком уменьшался, что соответствовало макроскопической картине во время препарации голени. Если в день санации объем вводимого гидрогеля полностью заполнял полость костномозгового канала и несколько пролабировал из посттрепанационных отверстий, то на 15 сутки материал в области дефектов и поверхностных слоях полости канала уже не визуализировался. При этом извлеченный гидрогель имел ярко-оранжевый цвет, значительно отличающийся от исходного цвета «кофе с молоком». На 30

и 45 сутки остатки гидрогеля светло-оранжевого и прозрачного светло-желтоватого цвета соответственно извлекали в существенно меньшем объеме из более глубоких слоев канала. Это лишь подтверждает биodeградируемые свойства полимерного гидрогеля, а перемена цвета – его высокую элюционную способность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как показало выполненное нами исследование, объем импрегнируемой навески антибактериальных препаратов для полимерного гидрогеля и костного цемента в целом одинаков и составляет не более 80 мг/см^3 . Однако, несмотря на схожесть импрегнируемых доз антибактериальных агентов в состав изучаемых депо-матриц, полимерные гидрогели показали высокую элюционную способность, которая на всем протяжении исследования существенно превосходила релиз из костного цемента. Все тестируемые гидрогелевые образцы в отличие от ПММА, продемонстрировавшего низкую долю элюции (не более 10 %), высвобождали более 70 % антибиотиков от их общего загруженного объема. Хотя обе матрицы показали первоначальное взрывное высвобождение, в случае полимерного гидрогеля уровни препарата, элюированного в раствор, были кратно выше и превышали МПК в течение всего периода наблюдения, в случае ПММА с 2 суток наблюдалось резкое снижение на порядок и более скорости релиза препарата, а к 2 неделе в растворе регистрировались уровни противомикробного агента ниже МПК. Такой высокий релиз антибактериальных препаратов из полимерного гидрогеля обусловлен диффузией частиц препаратов со всех слоев матрицы, что, несомненно, выгодно отличает его от костного цемента, обеспечивающего высвобождение препаратов в основном с поверхностных слоев порядка 2-3 мм. Помимо элюционных свойств отличалась и скорость высвобождения импрегнированных антибактериальных препаратов в исследуемые матрицы. Скорость релиза ванкомицина, загруженного в полимерный гидрогель, в первые дни наблюдения была в 7, вторые – в 17, третьи – в 12, и последующие дни в 2 раза выше по сравнению с ПММА. Схожая картина скорости релиза наблюдалась и для рифампицина и цефазолина, импрегнированных в гидрогелевый материал. Более того, у полимерного гидрогеля в нашем исследовании наблюдалась положительная корреляция между физико-химическими свойствами включенного препарата

и динамикой его высвобождения. В случае ПММА такой взаимосвязи не отмечено, динамика элюции, скорее всего, определяется гранулометрическим составом используемых субстанций препаратов.

Эффективность элюционных свойств полимерного гидрогеля, выявленная на первом этапе, подтвердилась и на втором этапе микробиологическим методом. Все тестируемые гидрогелевые образцы, содержащие ванкомицин, цефазолин, гентамицин и тобрамицин, в отличие от костного цемента показали продолжительную (более 1 недели) эффективную бактерицидную активность в отношении основных тестируемых возбудителей ортопедической инфекции. Равномерные диаметры зон подавления тест-культур вокруг полимерного гидрогеля в контрольные сроки в целом различались на 1-2 мм, что косвенно свидетельствует о контролируемом диффузном высвобождении антибиотиков из гидрогелевой матрицы. Противомикробное действие полимерного гидрогеля уже с первых суток исследования было достоверно выше бактерицидности костного цемента ($p=0,002$). К концу наблюдения диаметр зоны подавления вокруг гидрогеля был в 4 и более раза выше ($p=0,001$) по сравнению с ПММА. Вместе с тем, антимикробная активность гидрогелевой матрицы в течение всего периода исследования была равномерной и убывала без значимых изменений по сравнению с костным цементом, который с самого начала исследования продемонстрировал неравномерное подавление тест-культур микроорганизмов с резким достоверным падением активности ($p=0,042$) на 2 день наблюдения.

Полученное на 3 этапе эффективное подавление костной инфекции полимерным гидрогелем, содержащим антибактериальный препарат, на модели кроликов в целом подтверждает результаты 1 и 2 этапов исследования. Так, *in vivo* исследование показало, что имплантация полимерного гидрогеля во всех случаях способствует своевременному заживлению послеоперационной раны голени без дополнительной системной антибиотикотерапии, быстрому функциональному восстановлению

оперированной конечности и общего состояния животных. Начиная с 14 и 21 суток наблюдения достоверно быстрее и эффективнее снижает уровни маркеров воспаления. Клинико-лабораторная картина стихания хронического остеомиелита в опытной группе соответствовала результатам рентгенологического, микробиологического и гистоморфометрического исследований. Помимо эффективного постепенного достоверного ($p=0,002$) купирования инфекционно-воспалительного процесса гистоморфометрический анализ также показал отсутствие нарушений репаративного остеогенеза и каких-либо токсических и отрицательных реакций в костной ткани при имплантации полимерного гидрогеля. В сравнительной группе у 36,3 % животных заживление раны протекало с осложнением, из них в 9,1 %, несмотря на усиленную системную антибактериальную терапию, купирования инфекционного процесса не удалось добиться. Независимо от того, что в 2 случаях уровни WBC и СРБ к концу исследования были выше нормы, в среднем в данной группе отмечалось их снижение, но оно не было столь эффективным и достоверным, как в группе кроликов с имплантированным полимерным гидрогелем. Более того, клинико-лабораторная картина ремиссии костной инфекции не соответствовала полученным рентгенологическим и гистоморфометрическим результатам. Согласно последним, обнаруживались признаки прогрессирования и достоверного ($p=0,001$) обострения остеомиелита, которое проявлялось еще и усугублением резорбции костной ткани, более выраженной на границе с воспалительным инфильтратом. В группе животных без имплантации локальной системы каких-либо улучшений не было обнаружено.

Таким образом, резюмируя итоги каждого этапа исследования, мы можем утверждать, что биodeградируемые полимерные гидрогели на основе ненасыщенных производных поливинилового спирта могут обеспечивать механизм элюции антибиотиков, полностью основанный на диффузии, и высвобождать высокие эффективные концентрации включенных в состав

матрицы препаратов в течение продолжительного периода времени, что выгодно их отличает от костного цемента на основе ПММА, характеризующегося минимальным элюционным потенциалом. В довершение всего отсутствие при сшивке низкомолекулярного токсичного мономера, широкий спектр импрегнируемых антибиотиков, гидрофильная поверхность и биоразлагаемость, препятствующие адгезии микроорганизмов к своей поверхности и тем самым снижающие риск рецидива инфекции, эластичность, возможность регулировки текстуры материала и придания ей различных форм, простая и быстрая техника изготовления, минимальное время отверждения материала (до 5-10 сек), биосовместимость и отсутствие токсичности и отрицательной реакции со стороны костной ткани делают матрицу на основе полимерного гидрогеля наиболее подходящей в качестве эффективной локальной транспортной системы для лечения ортопедической инфекции.

Полученные нами результаты взаимодействия между матрицей гидрогеля и молекулами иммобилизуемых антибиотиков в дальнейшем могут позволить путем ее модификации, создавать системы с необходимым профилем высвобождения загружаемого антимикробного агента. На данном этапе исследовательской работы была показана возможность создания локальных депо-систем на основе поливинилового спирта с контролируемым релизом лекарственных средств, потенциально превосходящих по своим характеристикам применяемые в настоящее время в клинической практике системы на основе ПММА [36].

Данная работа является лишь первым шагом в изучении нового материала, но уже на этом этапе исследования гидрогель показал перспективы возможного успешного применения в клинической практике при лечении костно-суставной инфекции. В связи с чем полимерный гидрогель на основе ПВС требует дальнейшего исследования в клинических условиях.

ВЫВОДЫ

1. Максимальная доза включенного препарата в состав гидрогеля объемом 5 мл составляет 400 мкг/мл. Высокие элюционные свойства полимерного гидрогеля обеспечивают первоначальные концентрации до 3235 мг/л по сравнению с 433 мг/л у ПММА, а к концу исследования уровни высвобождаемых антибиотиков в отличие от костного цемента в 2-5 раз выше.
2. Полимерный гидрогель уже с первых дней исследования обладает достоверной ($p < 0,002$) высокоэффективной, пролонгированной и контролируемой антимикробной активностью в отношении ведущих возбудителей ортопедической инфекции по сравнению с костным цементом, бактерицидность которого кратковременна, неравномерна и значимо ($p < 0,042$) снижается со 2 суток исследования.
3. Согласно шкале HOES, полимерный гидрогель с антибиотиком, эффективно снижает степень выраженности хронического остеомиелита большеберцовой кости у кроликов с 4 до 2 баллов, что достоверно ($p=0,002$) выше по сравнению с ПММА, где картина клинко-лабораторного стихания костной инфекции не всегда соответствует полученным гистоморфометрическим результатам обострения остеомиелита, которые к концу исследования в среднем увеличились с 4 до 8 баллов ($p=0,001$).
4. Гидрогель на основе ПВС не влияет на репаративный остеогенез и не вызывает каких-либо токсических и отрицательных реакций в костной ткани по сравнению с ПММА, вызвавшего материал-ассоциированную резорбцию костной ткани на границе «кость-цемент», усугубившуюся с течением времени, что делает его перспективным для применения в клинической практике.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полимерный гидрогель на основе ненасыщенных производных поливинилового спирта является наиболее близкой к оптимальной локальной транспортной системой, которая имеет достаточные перспективы успешного применения не только при лечении гнойно-воспалительных ран, хронического остеомиелита длинных костей и перипротезной инфекции суставов, но и в целях профилактики предупреждения развития инфекционных осложнений. Для этого необходимо проведение клинических испытаний антибиотикнесущей гидрогелевой депо-системы.
2. Полимерный гидрогель не несет в себе частичную опорную функцию как костный цемент при лечении ППИ, однако им можно будет заполнить костномозговой канал костей и после имплантировать спейсер или эндопротез на 2 этапе двухэтапной методики, что позволит усилить местную антибактериальную терапию и в перспективе снизить процент неудовлетворительных исходов лечения.
3. Для получения более гелеобразной консистенции материала, позволяющей легко и полностью заполнить любой формы постоперационную полость, необходимо снизить концентрации иницирующих систем, таких как раствор соли Мора и ПСА до 135 мкл на 5 мл поливинилового спирта.
4. Введение в гемостатическую губку, уложенную в область костного дефекта большеберцовой кости, до 1,5 мл суточной взвеси тест-культуры *MSSA* с концентрацией $1,2 \times 10^9$ КОЕ/мл, соответствующей 4 Ед МакФарланд, позволяет в течение 21 дня добиться развития хронического остеомиелита.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Г – гидрогель

ГА – гидроксиапатит

ГМА – глицидилметакрилат

Грам(+) – грамположительные микроорганизмы

Грам(-) – грамотрицательные микроорганизмы

ДИ – доверительный интервал

ЗЗР – зона задержки роста

Контр – контрольная группа

КЦ – костный цемент

МПК – минимальная подавляющая концентрация

ПВС – поливиниловый спирт

ПГ – полимерный гидрогель

ПММА – полиметилметакрилат

ППИ – перипротезная инфекция

ПСА – пероксидисульфат аммония

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

СМ – соль Мора

СРБ – С-реактивный белок

ТКФ – трикальцийфосфат

Ca/P – соотношение кальция и фосфора

FDA – Food and Drug Administration; Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов

Hb – гемоглобин

HOES – Histopathological Osteomyelitis Evaluation Score; шкала гистопатологической оценки остеомиелита

Me – медиана

MSSA – метициллинчувствительный золотистый стафилококк

MRSA – метициллинрезистентный золотистый стафилококк

MSSE – метициллинчувствительный эпидермальный стафилококк

MRSE – метициллинрезистентный эпидермальный стафилококк

TiO₂ – диоксид титана

pH – водородный показатель

WBC – лейкоциты

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агаджанян, В.В. Биodeградируемые импланты в ортопедии и травматологии. Наш первый опыт/ В.В. Агаджанян, А.А. Пронских, В.А. Демина, В.И. Гомзяк, Н.Г. Седуш, С.Н. Чвалун // Политравма. 2016. №4. С. 85–93.
2. Артюхов, А.А. Сшитые гидрогели поливинилового спирта и их биомедицинское применение: дис. ... д-ра. хим. наук: 03.01.06 / Артюхов Александр Анатольевич. – М., 2017. – 307 с.
3. Афиногенов, Г.Е. Антимикробная биodeградируемая композиция на основе высокомолекулярного поливинилпирролидона для профилактики экспериментального остеомиелита / Г.Е. Афиногенов, Р.М. Тихилов, А.Г. Афиногенова, Т.Я. Богданова, М.В. Краснова, Е.Н. Даровская, Л.О. Анисимова, И.К. Лебедева, Т.М. Петрова // Травматология и ортопедия России. 2010. №3(57). С. 47–54.
4. Афиногенова, А.Г. Микробные биопленки ран: состояние вопроса / А.Г. Афиногенова, Е.Н. Даровская // Травматология и ортопедия России. – 2011. – 3(61). – С. 119-125.
5. Ахтямов, И.Ф. Использование двухполюсного спейсера в лечении инфекционных осложнений при артропластике крупных суставов / И.Ф. Ахтямов, Г.Г. Гарифуллов, И.Ш. Гильмутдинов, М.И. Митронин, Л.Б. Резник, Э.Б. Гатина // Актуальные проблемы медицины. – 2012. – том 2. -8(64). – С.13-15.
6. Батаков, Е.А. Актуальные вопросы лечения хронического остеомиелита / Е.А. Батаков // Самарский медицинский журнал. – 2006. - №1. С. 79-80
7. Бежин, А.И. Морфологическая оценка эффективности применения хитозан-коллагенового комплекса с наночастицами серебра и химотрипсином при гнойно-некротическом процессе в мягких тканях / А.И. Бежин, В.А. Липатов, Л.А. Блатун, Э.В. Фрончек, А.Ю. Григорьян, М.Д. Наимзада // *Раны и раневые инфекции. Журнал имени проф. Б.М. Костючёнка*. – 2019. – Т. 6(4). – С.14-21.

8. Божкова, С.А. Современные принципы диагностики и антибактериальной терапии инфекции протезированных суставов (обзор литературы) / С.А. Божкова // Травматология и ортопедия России. – 2011. – 3(61). – С. 126-136.
9. Божкова, С.А. Экспериментально-клиническое исследование фенотипических особенностей штаммов *S. Epidermidis* и их роль в возникновении и развитии имплантат-ассоциированной инфекции после ортопедических операций / С.А. Божкова, Т.Я. Богданова, М.В. Краснова, Л.О. Анисимова, Г.И. Нетылько, А.Н. Рукина, Лю Бо // Травматология и ортопедия России. – 2014. – 2(72). – С. 68-77
10. Божкова, С.А. Современные возможности локальной антибиотикотерапии перипротезной инфекции и остеомиелита (обзор литературы) / С.А. Божкова, А.А. Новокшонова, В.А. Конев // Травматология и ортопедия России. – 2015. – 3(77). – С. 92-103.
11. Божкова, С.А. Неблагоприятные тенденции в этиологии ортопедической инфекции: результаты 6-летнего мониторинга структуры и резистентности ведущих возбудителей / С.А. Божкова, А.Р. Касимова, Р.М. Тихилов, Е.М. Полякова, А.Н. Рукина, В.В. Шабанова, В.Н. Ливенцов // Травматология и ортопедия России. – 2018. – 24(4). – С. 20-31.
12. Божкова, С.А. Перипротезная инфекция коленного сустава грибковой этиологии (клинический случай) / С.А. Божкова, П.П. Иванов, Е.А. Землянская, Н.Н. Корнилов // Травматология и ортопедия России. – 2019. – 25(4). – С. 134-140.
13. Васильев, А.В. Разработка нового класса остеиндуктивных костно-пластических материалов на основе отверждаемых гидрогелей для применения в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии (экспериментальное исследование): дис. ... д-ра. мед. наук: 14.01.14 / Васильев Андрей Вячеславович. – М., 2020. – 292 с.
14. Винклер, Т. Классификация и алгоритм диагностики и лечения перипротезной инфекции тазобедренного сустава / Т. Винклер, А. Трампуш, Н. Ренц, К. Перка, С.А. Божкова // Травматология и ортопедия России. 2016. No 1 (79). С. 33-45.

15. Винник, Ю.С. Хронический остеомиелит: диагностика, лечение, профилактика / Ю.С. Винник, Н.М. Маркелова, А.А. Шагеев // Сибирское медицинское обозрение. 2009. №6. – 11 с.
16. Вырва, О.Е. Инфекционные осложнения первичного тотального эндопротезирования тазобедренного и коленного суставов / О.Е. Вырва, В.В. Бурлака, Р.В. Малык, К.И. Озеров // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2011. – №3. – С. 60-67.
17. Гараев, М.Р. Хирургическое лечение хронического остеомиелита / М.Р. Гараев, В.С. Пантелеев, М.А. Нартайлаков, В.Д. Дорофеев, Д.В. Инюшев, Д.С. Голков // Креативная хирургия и онкология. – 2019. – том 9. – №3. – С. 209-215.
18. Глушанова, Н.А. Бактериальные биопленки в инфекционной патологии человека / Н.А. Глушанова, А.И. Блинов, Н.Б. Алексеева // МвК. 2015. № Спецвыпуск 2. С. 30-35.
19. Горидонова, Л.Д. Септические артриты тазобедренного сустава / Л.Д. Горидонова, В.А. Филиппенко, О.Е. Вырва, К.К. Романенко // Травма. – 2004. – Т. 5. – №1. – С. 70-75.
20. Гостев, В.В. Бактериальные биопленки и инфекции / В.В. Гостев, С.В. Сидоренко // Журнал инфектологии. – 2010. - №2(3). – С. 4-15
21. Дзюба, Г.Г. Современные подходы к выполнению первого этапа ревизионного эндопротезирования тазобедренного сустава при поздних инфекционных осложнениях / Г.Г. Дзюба, Л.Б. Резник // Вреденовские чтения// Травматология и ортопедия России. – 2009. - 3(53). - С. 127-129.
22. Дзюба Г.Г., Резник Л.Б., Ерофеев С.А., Одарченко Д.И. Разработка универсальных подходов к лечению остеомиелитов длинных костей скелета на основе опорных локальных антибактериальных носителей// Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 2016. – №1. – С. 26-31
23. Дзюба Г.Г. Ортопедическая хирургия остеомиелитических кокситов: автореф. дис. ... д-ра. мед. наук: 14.01.15 / Дзюба Герман Григорьевич. - Омск, 2018. - 44 с.

24. Ермаков, А.М. Оценка эффективности двухэтапного хирургического лечения больных с перипротезной инфекцией коленного и тазобедренного суставов / А.М. Ермаков, Н.М. Ключин, Ю.В. Абабков, А.С. Тряпичников, А.Ю. Коюшков // Гений Ортопедии. – 2018. – 24(3). – С. 321-326.
25. Ерофеев, С.А. Лечение больных с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей на основе использования армирующего локального антибактериального носителя / С.А. Ерофеев, Г.Г. Дзюба, Д.И. Одарченко // Гений ортопедии. – 2013. - №4. – С. 25-29.
26. Кабанова, А.А. Способы воздействия на микробные биопленки. Состояние вопроса / А.А. Кабанова, И.О. Походенько-Чудакова, Ф.В. Плотников // Вестник проблем биологии и медицины. – 2015. – Том 2(125). - №4. – С. 20-24.
27. Кавалерский, Г.М. Ревизионная хирургия тазобедренного сустава: роль индивидуальных артикулирующих спейсеров / Г.М. Кавалерский, В.Ю. Мурылев, Я.А. Рукин, П.М. Елизаров, А.В. Музыченков // Кафедра травматологии и ортопедии. - №4(12). – 2014. – С. 4-8.
28. Кильметов, Т.А. Локальная антибиотикотерапия при инфекции области эндопротеза сустава / Т.А. Кильметов, И.Ф. Ахтямов, И.Ш. Гильмутдинов, Э.Б. Гатина, И.К. Ерёмин, Э.И.-О. Алиев, Х.Г.-О. Исмаилов // Казанский медицинский журнал (обзор литературы). - том 95. - №3. -2014. - С. 405-411.
29. Ключин, Н.М. Этиология острой перипротезной инфекции суставов и результаты хирургического лечения / Н.М. Ключин, А.М. Ермаков, З.С. Науменко, Ю.В. Абабков, А.С. Тряпичников, А.Н. Коюшков // Гений ортопедии. – 2017. – 23(4). – С. 417-422.
30. Кочиш, А.А. Экспериментальное исследование эффективности полимерной антимикробной композиции с гемостатическим эффектом в лечении имплантат-ассоциированной инфекции / А.А. Кочиш, С.А. Божкова, Г.И. Нетылько, Л.И. Анисимова // Гений ортопедии. – 2019. - том 25. - №2. - С. 180-187.
31. Куковенко, Г.А. Важность выполнения алгоритма диагностики поздней глубокой перипротезной инфекции тазобедренного сустава / Г.А. Куковенко,

- П.М. Елизаров, С.С. Алексеев, Г.Л. Сорокина, Л.Р. Иваненко, Н.Е. Ерохин, А.В. Музыченков, В.Ю. Мурылев // Травматология и ортопедия России. – 2019. – 25(4). – С. 75-87.
32. Курмангалиев, Е-Д. Т. Применение оригинальных, изготавливаемых во время операции спейсеров из костного цемента для выполнения первого этапа двухэтапной ревизии септического эндопротеза коленного сустава: дис. ... кан. мед. наук: 14.01.15 / Курмангалиев Еркин-Дауир Толеуович. – М., 2018. – 117 с.
33. Ландау, Л.Д. Теоретическая физика: т. 7. Теория упругости / Л.Д. Ландау, Е.М. Лифшиц. — М.: Наука, 1987. — 248 с.
34. Леонова, С.Н. Результаты ревизионного эндопротезирования крупных суставов при перипротезной инфекции / С.Н. Леонова, А.Л. Камека, А.Н. Грищук // Acta biomedica scientifica. – 2019. – Vol. 4. - №6. – P. 108-111.
35. Марданова, А.М. Биопленки: Основные принципы организации и методы исследования: учебно-методическое пособие / А.М. Марданова, Д.А. Кабанов, Н.Л. Рудакова, М.Р. Шарипова. – Казань: К(П)ФУ. – 2016. – 42 с.
36. Меликова, Р.Э. In vitro исследование динамики элюции антибактериальных препаратов, импрегнированных в матрицы на основе полимерного гидрогеля / Р.Э. Меликова, А.В. Цискарашвили, А.А. Артюхов, Н.В. Соколова // Гений ортопедии. – 2023. – Т. 29. – № 1. – С. 64-70.
37. 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. - том 25. - №4. – С. 610-621.
38. Моргачёва, А.А. Синтез поливинилового спирта с метакрилатными группами и гидрогелей на его основе / А.А. Моргачёва, А.А. Артюхов, А.В. Панов, М.Г. Гордиенко, Я.О. Межуев, М.И. Штильман // Журнал прикладной химии. — 2015. —Т. 88. — № 4. — С. 585-589
39. Мурылев, В.Ю. Алгоритм первого этапа лечения поздней глубокой перипротезной инфекции тазобедренного сустава / В.Ю. Мурылев, Г.А.

- Куковенко, П.М. Елизаров, Л.Р. Иваненко, Г.Л. Сорокина, Я.А. Рукин, С.С. Алексеев, В.Г. Германов // Травматология и ортопедия России. – 2018. – 24 (4). – С. 95-104.
40. Николаев, Н.С. Практические рекомендации по диагностике имплант-ассоциированной инфекции при эндопротезировании крупных суставов в современных условиях / Н.С. Николаев, Л.В. Борисова, Н.Н. Пчелова, А.В. Орлова, А.Н. Каралин // Медицинский альманах. – 2016. - №3(43). – С. 40-45.
41. Одарченко, Д.И. Применение локальных армирующих антибактериальных носителей при лечении хронического остеомиелита длинных трубчатых костей: автореф. дис. ... кан. мед. наук: 14.01.15 / Одарченко Дмитрий Игоревич. – Курган., 2013. – 18 с.
42. Окулич, В.К. Микробиологические и иммунологические аспекты инфекций, вызванных условно-патогенными бактериями, образующими биопленку / В.К. Окулич // Вестник ВГМУ. – 2016. – том 15. - №5. – С. 52-63.
43. Патент № 2195320 Российская Федерация А 61 L 27/28. Полимерная композиция для хирургического костного цемента : № 2001109075/14 : заявл. 02.04.2001 : опубл. 27.12.2002 / Кондратьев В.М., Глинских А.Ф., Навалихин В.Д., Корнилов Н.В., Хомяк Н.И., Машков В.М., Мамаева Е.Г. – 7 с.
44. Патент № 2622209 Российская Федерация МПК G 09 B 23/28. Способ моделирования локализованного метафизарного хронического остеомиелита у кролика : № 2016117035 : заявл. 28.04.2016 : опубл. 13.06.2017 / Конев В.А., Божкова С.А., Нетылько Г.И., Румакин В.П., Афанасьев А.В. – 14 с.
45. Патент № 2729025 Российская Федерация МПК А 61 В 17/56 А 61 М 27/00 А 61 К 31/7036 А 61 К 38/14) А 61 К 47/58 А 61 К 47/69 А 61 Р 19/00 А 61 Р 31/04 А 61 В 6/08 А 61 В 8/00 Способ хирургического лечения гнойно-воспалительных процессов костных и мягкотканых структур опорно-двигательной системы пациента с использованием мягких спейсеров, импрегнированных антибактериальными средствами : № 2019122884 : заявл. 19.07.2019 : опубл. 03.08.2020 / Цискарашвили А.В., Меликова Р.Э. – 13 с.

46. Патент № 2730838 Российская Федерация МПК А 61 В 17/56. Способ хирургического лечения гнойно-воспалительных процессов костных и мягкотканых структур опорно-двигательной системы пациента с использованием мягких спейсеров, импрегнированных аминогликозидом и гликопептидом : № 2019122882 : заявл. 19.07.2019 : опубл. 26.08.2020 / Цискарашвили А.В., Меликова Р.Э. – 12 с.
47. Педаченко, Е.Г. Современные костные цементы для пункционной вертебропластики (обзор литературы) / Е.Г. Педаченко, С.В. Куцаев // Украинский нейрохирургический журнал. – 2001. - №4. – С. 24-31.
48. Петухов, И.Н. Инфекции, связанные с установкой инородных материалов (протезы, сетки, импланты) / И.Н. Петухов, А.В. Соколовский, З.В. Григорьевская, Н.С. Багирова, И.В. Терещенко, Г.В. Варлан, В.В. Агинова, Н.В. Дмитриева // Злокачественные опухоли. – 2017. – том 7. - №3. – С. 57-60.
49. Преображенский, П.М. Современные взгляды на диагностику и лечение пациентов с перипротезной инфекцией после эндопротезирования коленного сустава / П.М. Преображенский, А.В. Каземирский, М.Ю. Гончаров // Гений ортопедии. – 2016. - №3. – С. 94-104.
50. Преображенский, П.М. Результаты этапного лечения пациентов с перипротезной инфекцией после эндопротезирования коленного сустава / П.М. Преображенский, С.А. Божкова, А.В. Каземирский, М.Ю. Гончаров // Травматология и ортопедия России. – 2017. – 23(1). – С. 98-107.
51. Привольнев, В.В. Местное применение антибиотиков в лечении инфекций костной ткани / В.В. Привольнев, А.В. Родин, Е.В. Каракулина // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2012. –том 14. - №2. – С. 118-131.
52. Прохоренко, В.М. Лечение парапротезной инфекции коленного сустава / В.М. Прохоренко, А.В. Злобин, А.А. Мамедов, В.С. Байтов // Современные проблемы науки и образования – 2015. – №6.
53. Римашевский, Д.В. Метод двухэтапной ревизии при глубокой парапротезной инфекции эндопротеза коленного сустава / Д.В. Римашевский, Е.-Д.Т.

Курмангалиев, И.Ф. Ахтямов, А.А. Белокобылов, А.Е. Али, А.А. Алибеков // Инновационные технологии в медицине. – 2014. – том 2. – 4(80). – С.123-127.

54. Роговина, Л.З. Регулярные сетки на основе α,ω -дигидроксиолигодиметилсилоксана, полученные при различных условиях разбавления / Л.З. Роговина, В.Г. Васильев, Г.Л. Слонимский // Высокомолек. Соед. А. — 1982. — Т. 24, № 2.— С. 254–260.
55. Слободской, А.Б. Факторы риска развития перипротезной инфекции после эндопротезирования крупных суставов / А.Б. Слободской, Е.Ю. Осинцев, А.Г. Лежнев, И.В. Воронин, И.С. Бадак, А.Г. Дунаев // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 2015. - №2. – С.13-18.
56. Соколова, Т.Н. Микробные биопленки и способы их обнаружения / Т.Н. Соколова // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2014. - №4. – С. 12-15.
57. Тапальский, Д.В. Биосовместимые композиционные антибактериальные покрытия для защиты имплантатов от микробных биопленок / Д.В. Тапальский, В.А. Осипов, Г.Н. Сухая, М.А. Ярмоленко, А.А. Рогачев, А.В. Рогачев // Проблемы здоровья и экологии. – 2013. – С. 129-134.
58. Тапальский, Д.В. Антибактериальная активность покрытий на основе импрегнированного антибиотиками костного цемента в отношении микроорганизмов с различными уровнями антибиотикорезистентности / Д.В. Тапальский, П.А. Волоотовский, А.И. Козлова, А.А. Ситник // Травматология и ортопедия России. – 2018. - том 24. - №4. – С. 105-110.
59. Тец, В.В. Микробные биопленки и проблема антибиотикотерапии / В.В. Тец, Г.В. Тец // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. - 2013. - №4. – С. 60-64.
60. Тихилов, Р.М. Данные регистра эндопротезирования тазобедренного сустава РНИИТО им. Р.Р. Вредена за 2007-2012 годы / Р.М. Тихилов, И.И. Шубняков, А.Н. Коваленко, А.Ж. Черный, Ю.В. Муравьева, М.Ю. Гончаров // Травматология и ортопедия России. – 2013. - №3. – С. 167-190.

61. Тихилов Р.М., Шубняков И.И., Коваленко А.Н., Тотоев З.А., Лю Бо., Билык С.С. Структура ранних ревизий эндопротезирования тазобедренного сустава// Травматология и ортопедия России. – 2014. - №2. – С. 5-13
62. Тулеубаев, Б.Е. Импрегнация антибиотиком костного аллогraftа: микробиологический сравнительный анализ / Б.Е. Тулеубаев, Д.А. Сагинова, А.М. Сагинов, Э.Р. Ташметов, А.А. Кошанова, А.М. Беляев // Новости хирургии. - 2019. - №5. - С. 489–495.
63. Цискарашвили, А.В. Биомеханически обоснованный чрескостный остеосинтез у пациентов с ложными суставами бедренной кости, осложненными хроническим остеомиелитом / А.В. Цискарашвили, А.В. Жадин, К.А. Кузьменков, Р.Э. Меликова // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 2018. – Т. 3. – № 4. – С. 71-78.
64. Цискарашвили, А.В. Биомеханически обоснованный чрескостный остеосинтез в лечении переломов плечевой кости, осложненных хроническим остеомиелитом, и их последствий / А.В. Цискарашвили, Р.Э. Меликова, А.В. Жадин, К.А. Кузьменков // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 2020. – Т. 27. – № 4. – С. 28-40.
65. Цискарашвили, А.В. Анализ шестилетнего мониторинга основных возбудителей перипротезной инфекции крупных суставов и их тенденция к резистентности / А.В. Цискарашвили, Р.Э. Меликова, Е.А. Новожилова // Гений ортопедии. – 2022. – Т. 28. – № 2. – С. 179-188.
66. Цискарашвили, А.В. In vitro исследование антимикробной активности матриц на основе гидрогеля, импрегнированных антибиотиками, в отношении ведущих микроорганизмов ортопедической инфекции / А.В. Цискарашвили, Р.Э. Меликова, Т.Я. Пхакадзе, А.А. Артюхов, Н.В. Сокурова // Гений ортопедии. – 2022. – Т. 28. – № 6. – С. 794-802.
67. Чудных, С.М. Применение биodeградирующего материала ММ-гель при лечении больных с нагноением промежностных ран после перенесенной операции эвисцерации малого таза / С.М. Чудных, М.И. Штильман, К.А.

Павленко, М.А. Данилов, Г.Г. Саакян, В.С. Егоров // Кремлевская медицина. Клинический вестник. – 2022. – № 4. – С. 84-87.

68. Шварц, Т.А. Биопленки как микробное сообщество / Т.А. Шварц // Вестник КГУ. – 2015. - №1. – С.41-44.
69. Шевченко, Ю.Л. Локальная антибиотикотерапия при эндопротезировании крупных суставов (литературный обзор) / Ю.Л. Шевченко, Ю.М. Стойко, А.А. Грицюк, П.Д. Кузьмин, И.А. Папаценко, А.П. Серeda // Вестник НМХЦ им. Н.И. Пирогова. – 2010. – том 5. – №3. – С. 44-56.
70. Шпиняк, С.П. Применение спейсеров в лечении инфекционных осложнений тотального эндопротезирования коленного сустава / С.П. Шпиняк, А.П. Барабаш, А.В. Лясникова // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №5. – 10 с.
71. Al Thaher Y, Yang L, Jones SA, Perni S, Prokopovich P. LbL-assembled gentamicin delivery system for PMMA bone cements to prolong antimicrobial activity. PLoS One. 2018 Dec 13;13(12):e0207753. doi: 10.1371/journal.pone.0207753. PMID: 30543660; PMCID: PMC6292632
72. Amin TJ, Lamping JW, Hendricks KJ, McIff TE. Increasing the elution of vancomycin from high-dose antibiotic-loaded bone cement: a novel preparation technique. J Bone Joint Surg Am. 2012 Nov 7;94(21):1946-51. doi: 10.2106/JBJS.L.00014. PMID: 23014891
73. Anagnostakos K, Kelm J, Regitz T, Schmitt E, Jung W. In vitro evaluation of antibiotic release from and bacteria growth inhibition by antibiotic-loaded acrylic bone cement spacers. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2005 Feb 15;72(2):373-8. doi: 10.1002/jbm.b.30171. PMID: 15578650
74. Anagnostakos K, Meyer C. Antibiotic Elution from Hip and Knee Acrylic Bone Cement Spacers: A Systematic Review. Biomed Res Int. 2017;2017:4657874. doi: 10.1155/2017/4657874. Epub 2017 Jun 5. PMID: 28656144; PMCID: PMC5474553
75. Anagnostakos K, Schröder K. Antibiotic-impregnated bone grafts in orthopaedic and trauma surgery: a systematic review of the literature. Int J Biomater.

2012;2012:538061. doi: 10.1155/2012/538061. Epub 2012 Jul 26. PMID: 22899933; PMCID: PMC3412111

76. Anderson JA, Sculco PK, Heitkemper S, Mayman DJ, Bostrom MP, Sculco TP. An articulating spacer to treat and mobilize patients with infected total knee arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2009 Jun;24(4):631-5. doi: 10.1016/j.arth.2008.04.003. Epub 2008 May 14. PMID: 18534535
77. Anguita-Alonso P, Rouse MS, Piper KE, Jacofsky DJ, Osmon DR, Patel R. Comparative study of antimicrobial release kinetics from polymethylmethacrylate. *Clin Orthop Relat Res*. 2006 Apr;445:239-44. doi: 10.1097/01.blo.0000201167.90313.40. PMID: 16474225
78. Balato G, Ascione T, Rosa D, Pagliano P, Solarino G, Moretti B, Mariconda M. Release of gentamicin from cement spacers in two-stage procedures for hip and knee prosthetic infection: an in vivo pharmacokinetic study with clinical follow-up. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2015 Oct-Dec;29(4 Suppl):63-72. PMID: 27019271
79. Balato G, Roscetto E, Vollaro A, Galasso O, Gasparini G, Ascione T, Catania MR, Mariconda M. Bacterial biofilm formation is variably inhibited by different formulations of antibiotic-loaded bone cement in vitro. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2019 Jun;27(6):1943-1952. doi: 10.1007/s00167-018-5230-x. Epub 2018 Oct 28. PMID: 30370437
80. Beenken KE, Bradney L, Bellamy W, Skinner RA, McLaren SG, Gruenwald MJ, Spencer HJ, Smith JK, Haggard WO, Smeltzer MS. Use of xylitol to enhance the therapeutic efficacy of polymethylmethacrylate-based antibiotic therapy in treatment of chronic osteomyelitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Nov;56(11):5839-44. doi: 10.1128/AAC.01127-12. Epub 2012 Sep 4. PMID: 22948866; PMCID: PMC3486578
81. Benito N, Franco M, Coll P, Gálvez ML, Jordán M, López-Contreras J, Pomar V, Monllau JC, Mirelis B, Gurguí M. Etiology of surgical site infections after primary total joint arthroplasties. *J Orthop Res*. 2014 May;32(5):633-7. doi: 10.1002/jor.22581. Epub 2014 Jan 16. PMID: 24436163

82. Benito N, Franco M, Ribera A, Soriano A, Rodriguez-Pardo D, Sorlí L, Fresco G, Fernández-Sampedro M, Dolores Del Toro M, Guío L, Sánchez-Rivas E, Bahamonde A, Riera M, Esteban J, Baraia-Etxaburu JM, Martínez-Alvarez J, Jover-Sáenz A, Dueñas C, Ramos A, Sobrino B, Euba G, Morata L, Pigrau C, Coll P, Mur I, Ariza J; REIPI (Spanish Network for Research in Infectious Disease) Group for the Study of Prosthetic Joint Infections. Time trends in the aetiology of prosthetic joint infections: a multicentre cohort study. *Clin Microbiol Infect.* 2016 Aug;22(8):732.e1-8. doi: 10.1016/j.cmi.2016.05.004. Epub 2016 May 13. PMID: 27181408
83. Bertazzoni Minelli E, Benini A, Magnan B, Bartolozzi P. Release of gentamicin and vancomycin from temporary human hip spacers in two-stage revision of infected arthroplasty. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Feb;53(2):329-34. doi: 10.1093/jac/dkh032. Epub 2003 Dec 19. PMID: 14688051
84. Bertazzoni Minelli E, Della Bora T, Benini A. Different microbial biofilm formation on polymethylmethacrylate (PMMA) bone cement loaded with gentamicin and vancomycin. *Anaerobe.* 2011 Dec;17(6):380-3. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.03.013. Epub 2011 Apr 16. PMID: 21515396
85. Birt MC, Anderson DW, Bruce Toby E, Wang J. Osteomyelitis: Recent advances in pathophysiology and therapeutic strategies. *J Orthop.* 2016 Oct 26;14(1):45-52. doi: 10.1016/j.jor.2016.10.004. PMID: 27822001; PMCID: PMC5090239
86. Bishop AR, Kim S, Squire MW, Rose WE, Ploeg HL. Vancomycin elution, activity and impact on mechanical properties when added to orthopedic bone cement. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2018 Nov;87:80-86. doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.06.033. Epub 2018 Jun 28. PMID: 30048880
87. Bistolfi A, Massazza G, Verné E, Massè A, Deledda D, Ferraris S, Miola M, Galetto F, Crova M. Antibiotic-loaded cement in orthopedic surgery: a review. *ISRN Orthop.* 2011 Aug 7;2011:290851. doi: 10.5402/2011/290851. PMID: 24977058; PMCID: PMC4063209
88. Bozic KJ, Lau E, Kurtz S, Ong K, Rubash H, Vail TP, Berry DJ. Patient-related risk factors for periprosthetic joint infection and postoperative mortality following total

- hip arthroplasty in Medicare patients. *J Bone Joint Surg Am*. 2012 May 2;94(9):794-800. doi: 10.2106/JBJS.K.00072. PMID: 22552668
89. Breusch SJ, Kühn KD. Knochenzemente auf Basis von Polymethylmethacrylat [Bone cements based on polymethylmethacrylate]. *Orthopade*. 2003 Jan;32(1):41-50. German. doi: 10.1007/s00132-002-0411-0. PMID: 12557085
90. Bühne KH, Bohndorf K. Imaging of posttraumatic osteomyelitis. *Semin Musculoskelet Radiol*. 2004 Sep;8(3):199-204. doi: 10.1055/s-2004-835360. PMID: 15478023
91. Cai XZ, Chen XZ, Yan SG, Ruan ZR, Yan RJ, Ji K, Xu J. Intermittent watt-level ultrasonication facilitates vancomycin release from therapeutic acrylic bone cement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009 Jul;90(1):11-7. doi: 10.1002/jbm.b.31288. PMID: 19090490
92. Castelli CC, Gotti V, Ferrari R. Two-stage treatment of infected total knee arthroplasty: two to thirteen year experience using an articulating preformed spacer. *Int Orthop*. 2014 Feb;38(2):405-12. doi: 10.1007/s00264-013-2241-6. Epub 2014 Jan 26. PMID: 24464017; PMCID: PMC3923954
93. Chang Y, Chen WC, Hsieh PH, Chen DW, Lee MS, Shih HN, Ueng SW. In vitro activities of daptomycin-, vancomycin-, and teicoplanin-loaded polymethylmethacrylate against methicillin-susceptible, methicillin-resistant, and vancomycin-intermediate strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Dec;55(12):5480-4. doi: 10.1128/AAC.05312-11. Epub 2011 Sep 19. PMID: 21930872; PMCID: PMC3232791
94. Chen IC, Su CY, Nien WH, Huang TT, Huang CH, Lu YC, Chen YJ, Huang GC, Fang HW. Influence of Antibiotic-Loaded Acrylic Bone Cement Composition on Drug Release Behavior and Mechanism. *Polymers (Basel)*. 2021 Jul 8;13(14):2240. doi: 10.3390/polym13142240. PMID: 34300997; PMCID: PMC8309450
95. Cierny G 3rd, DiPasquale D. Treatment of chronic infection. *J Am Acad Orthop Surg*. 2006;14(10 Spec No.):S105-10. doi: 10.5435/00124635-200600001-00025. PMID: 17003180

96. Cobo F, Rodríguez-Granger J, Sampedro A, Aliaga-Martínez L, Navarro-Marí JM. *Candida* Prosthetic Joint Infection. A Review of Treatment Methods. *J Bone Jt Infect.* 2017 Feb 5;2(2):114-121. doi: 10.7150/jbji.17699. PMID: 28540147; PMCID: PMC5441142
97. Comba F, Buttaro M, Pusso R, Piccaluga F. Acetabular revision surgery with impacted bone allografts and cemented cups in patients younger than 55 years. *Int Orthop.* 2009 Jun;33(3):611-6. doi: 10.1007/s00264-007-0503-x. Epub 2008 Feb 9. PMID: 18264707; PMCID: PMC2903100
98. Corvec S, Portillo ME, Pasticci BM, Borens O, Trampuz A. Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. *Int J Artif Organs.* 2012 Oct;35(10):923-34. doi: 10.5301/ijao.5000168. PMID: 23138706
99. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999 May 21;284(5418):1318-22. doi: 10.1126/science.284.5418.1318. PMID: 10334980
100. Cunha MT, Murça MA, Nigro S, Klautau GB, Salles MJC. In vitro antibacterial activity of bioactive glass S53P4 on multiresistant pathogens causing osteomyelitis and prosthetic joint infection. *BMC Infect Dis.* 2018 Apr 3;18(1):157. doi: 10.1186/s12879-018-3069-x. PMID: 29614973; PMCID: PMC5883601
101. Cyphert EL, Learn GD, Hurley SK, Lu CY, von Recum HA. An Additive to PMMA Bone Cement Enables Postimplantation Drug Refilling, Broadens Range of Compatible Antibiotics, and Prolongs Antimicrobial Therapy. *Adv Healthc Mater.* 2018 Nov;7(21):e1800812. doi: 10.1002/adhm.201800812. Epub 2018 Aug 28. PMID: 30152602
102. Donaldson AJ, Thomson HE, Harper NJ, Kenny NW. Bone cement implantation syndrome. *Br J Anaesth.* 2009 Jan;102(1):12-22. doi: 10.1093/bja/aen328. PMID: 19059919
103. Drago L, Agrappi S, Bortolin M, Toscano M, Romanò CL, De Vecchi E. How to Study Biofilms after Microbial Colonization of Materials Used in Orthopaedic Implants. *Int J Mol Sci.* 2016 Feb 26;17(3):293. doi: 10.3390/ijms17030293. PMID: 26927075; PMCID: PMC4813157

104. Drago L, De Vecchi E, Bortolin M, Zagra L, Romanò CL, Cappelletti L. Epidemiology and Antibiotic Resistance of Late Prosthetic Knee and Hip Infections. *J Arthroplasty*. 2017 Aug;32(8):2496-2500. doi: 10.1016/j.arth.2017.03.005. Epub 2017 Mar 15. PMID: 28390886
105. Dudareva M, Hotchen AJ, Ferguson J, Hodgson S, Scarborough M, Atkins BL, McNally MA. The microbiology of chronic osteomyelitis: Changes over ten years. *J Infect*. 2019 Sep;79(3):189-198. doi: 10.1016/j.jinf.2019.07.006. Epub 2019 Jul 15. PMID: 31319142
106. Dunne N, Buchanan F, Hill J, Newe C, Tunney M, Brady A, Walker G. In vitro testing of chitosan in gentamicin-loaded bone cement: no antimicrobial effect and reduced mechanical performance. *Acta Orthop*. 2008 Dec;79(6):851-60. doi: 10.1080/17453670810016957. PMID: 19085505
107. Dunne N, Hill J, McAfee P, Todd K, Kirkpatrick R, Tunney M, Patrick S. In vitro study of the efficacy of acrylic bone cement loaded with supplementary amounts of gentamicin: effect on mechanical properties, antibiotic release, and biofilm formation. *Acta Orthop*. 2007 Dec;78(6):774-85. doi: 10.1080/17453670710014545. PMID: 18236183
108. Dunne NJ, Orr JF. Influence of mixing techniques on the physical properties of acrylic bone cement. *Biomaterials*. 2001 Jul;22(13):1819-26. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00363-x. PMID: 11396886
109. Dusane DH, Diamond SM, Knecht CS, Farrar NR, Peters CW, Howlin RP, Swearingen MC, Calhoun JH, Plaut RD, Nocera TM, Granger JF, Stoodley P. Effects of loading concentration, blood and synovial fluid on antibiotic release and anti-biofilm activity of bone cement beads. *J Control Release*. 2017 Feb 28;248:24-32. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.01.005. Epub 2017 Jan 10. PMID: 28087408
110. Emerson RH Jr, Muncie M, Tarbox TR, Higgins LL. Comparison of a static with a mobile spacer in total knee infection. *Clin Orthop Relat Res*. 2002 Nov;(404):132-8. doi: 10.1097/00003086-200211000-00023. PMID: 12439251
111. Ensing GT, Hendriks JG, Jongsma JE, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. The influence of ultrasound on the release of gentamicin from antibiotic-loaded

- acrylic beads and bone cements. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005 Oct;75(1):1-5. doi: 10.1002/jbm.b.30140. PMID: 16044459
112. Foster AL, Boot W, Stenger V, D'Este M, Jaiprakash A, Eglin D, Zeiter S, Richards RG, Moriarty TF. Single-stage revision of MRSA orthopedic device-related infection in sheep with an antibiotic-loaded hydrogel. *J Orthop Res.* 2021 Feb;39(2):438-448. doi: 10.1002/jor.24949. Epub 2020 Dec 23. PMID: 33305875
113. Fritsch E, Rupp S, Kaltenkirchen N. Does vacuum-mixing improve the fatigue properties of high-viscosity poly(methyl-methacrylate) (PMMA) bone cement? Comparison between two different evacuation methods. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1996;115(3-4):131-5. doi: 10.1007/BF00434539. PMID: 8861576
114. Fritsch EW. Static and fatigue properties of two new low-viscosity PMMA bone cements improved by vacuum mixing. *J Biomed Mater Res.* 1996 Aug;31(4):451-6. doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(199608)31:4<451::AID-JBM3>3.0.CO;2-K. PMID: 8836840
115. Frutos Cabanillas P, Díez Peña E, Barrales-Rienda JM, Frutos G. Validation and in vitro characterization of antibiotic-loaded bone cement release. *Int J Pharm.* 2000 Nov 19;209(1-2):15-26. doi: 10.1016/s0378-5173(00)00520-2. PMID: 11084242
116. Frutos G, Pastor JY, Martínez N, Virto MR, Torrado S. Influence of lactose addition to gentamicin-loaded acrylic bone cement on the kinetics of release of the antibiotic and the cement properties. *Acta Biomater.* 2010 Mar;6(3):804-11. doi: 10.1016/j.actbio.2009.08.028. Epub 2009 Aug 22. PMID: 19703595
117. Funk GA, Menuey EM, Ensminger WP, Kilway KV, McIff TE. Elution of rifampin and vancomycin from a weight-bearing silorane-based bone cement. *Bone Joint Res.* 2021 Apr;10(4):277-284. doi: 10.1302/2046-3758.104.BJR-2020-0430.R1. PMID: 33845590; PMCID: PMC8077179
118. Gálvez-López R, Peña-Monje A, Antelo-Lorenzo R, Guardia-Olmedo J, Moliz J, Hernández-Quero J, Parra-Ruiz J. Elution kinetics, antimicrobial activity, and mechanical properties of 11 different antibiotic loaded acrylic bone cement. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014 Jan;78(1):70-4. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.09.014. Epub 2013 Oct 5. PMID: 24231380

119. Gandomkarzadeh M, Mahboubi A, Moghimi HR. Release behavior, mechanical properties, and antibacterial activity of ciprofloxacin-loaded acrylic bone cement: a mechanistic study. *Drug Dev Ind Pharm.* 2020 Aug;46(8):1209-1218. doi: 10.1080/03639045.2020.1788058. Epub 2020 Jul 8. PMID: 32594777
120. Garvin KL, Konigsberg BS. Infection following total knee arthroplasty: prevention and management. *Instr Course Lect.* 2012;61:411-9. PMID: 22301250
121. Gasparini G, De Gori M, Calonego G, Della Bora T, Caroleo B, Galasso O. Drug elution from high-dose antibiotic-loaded acrylic cement: a comparative, in vitro study. *Orthopedics.* 2014 Nov;37(11):e999-1005. doi: 10.3928/01477447-20141023-57. PMID: 25361377
122. Giavaresi G, Bertazzoni Minelli E, Sartori M, Benini A, Parrilli A, Maltarello MC, Salamanna F, Torricelli P, Giardino R, Fini M. New PMMA-based composites for preparing spacer devices in prosthetic infections. *J Mater Sci Mater Med.* 2012 May;23(5):1247-57. doi: 10.1007/s10856-012-4585-7. Epub 2012 Feb 23. PMID: 22359213
123. Gimza BD, Cassat JE. Mechanisms of Antibiotic Failure During *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis. *Front Immunol.* 2021 Feb 12;12:638085. doi: 10.3389/fimmu.2021.638085. PMID: 33643322; PMCID: PMC7907425
124. Goldman R.T., Scuderi G.R., Insall J.N. 2-stage reimplantation for infected total knee replacement. *Clin Orthop Relat Res.* 1996;(331):118-124. doi: 10.1097/00003086-199610000-00016
125. Griffin JW, Guillot SJ, Redick JA, Browne JA. Removed antibiotic-impregnated cement spacers in two-stage revision joint arthroplasty do not show biofilm formation in vivo. *J Arthroplasty.* 2012 Dec;27(10):1796-9. doi: 10.1016/j.arth.2012.06.019. PMID: 23146367
126. Gutiérrez D, Martínez B, Rodríguez A, García P. Genomic characterization of two *Staphylococcus epidermidis* bacteriophages with anti-biofilm potential. *BMC Genomics.* 2012 Jun 8;13:228. doi: 10.1186/1471-2164-13-228. PMID: 22681775; PMCID: PMC3505474

127. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol.* 2009 Jul;11(7):1034-43. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x. Epub 2009 Apr 6. PMID: 19374653
128. Hinarejos P, Guirro P, Leal J, Montserrat F, Pelfort X, Sorli ML, Horcajada JP, Puig L. The use of erythromycin and colistin-loaded cement in total knee arthroplasty does not reduce the incidence of infection: a prospective randomized study in 3000 knees. *J Bone Joint Surg Am.* 2013 May 1;95(9):769-74. doi: 10.2106/JBJS.L.00901. PMID: 23636182
129. Hrouz J., Ilavsky M., Havlicek I., Dusek K. Comparison of the penetration, tensile and compression moduli of elasticity of poly(n-alkyl acrylate) networks in the rubberlike state // *Collect. Czech. Chem. Commun.* — 1978. — Vol. 43. № 8. — 1999–2007 p.
130. Hsieh PH, Chang YH, Chen SH, Ueng SW, Shih CH. High concentration and bioactivity of vancomycin and aztreonam eluted from Simplex cement spacers in two-stage revision of infected hip implants: a study of 46 patients at an average follow-up of 107 days. *J Orthop Res.* 2006 Aug;24(8):1615-21. doi: 10.1002/jor.20214. PMID: 16788986
131. Hsieh PH, Huang KC, Tai CL. Liquid gentamicin in bone cement spacers: in vivo antibiotic release and systemic safety in two-stage revision of infected hip arthroplasty. *J Trauma.* 2009 Mar;66(3):804-8. doi: 10.1097/TA.0b013e31818896cc. PMID: 19276757
132. Hsu YM, Liao CH, Wei YH, Fang HW, Hou HH, Chen CC, Chang CH. Daptomycin-loaded polymethylmethacrylate bone cement for joint arthroplasty surgery. *Artif Organs.* 2014 Jun;38(6):484-92. doi: 10.1111/aor.12197. Epub 2013 Oct 29. PMID: 24571555
133. Huang CY, Hsieh RW, Yen HT, Hsu TC, Chen CY, Chen YC, Lee CC. Short- versus long-course antibiotics in osteomyelitis: A systematic review and meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents.* 2019 Mar;53(3):246-260. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.01.007. Epub 2019 Jan 10. PMID: 30639627

134. Jackson J, Leung F, Duncan C, Mugabe C, Burt H. The use of bone cement for the localized, controlled release of the antibiotics vancomycin, linezolid, or fusidic acid: effect of additives on drug release rates and mechanical strength. *Drug Deliv Transl Res.* 2011 Apr;1(2):121-31. doi: 10.1007/s13346-011-0015-5. PMID: 25788111
135. Jacobs C, Christensen CP, Berend ME. Static and mobile antibiotic-impregnated cement spacers for the management of prosthetic joint infection. *J Am Acad Orthop Surg.* 2009 Jun;17(6):356-68. doi: 10.5435/00124635-200906000-00004. PMID: 19474445
136. Kalteis T, Lüring C, Gugler G, Zysk S, Caro W, Handel M, Grifka J. Akute Gewebetoxizität von PMMA-Knochenzementen [Acute tissue toxicity of PMMA bone cements]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 2004 Nov-Dec;142(6):666-72. German. doi: 10.1055/s-2004-832317. PMID: 15614645
137. Kelm J, Regitz T, Schmitt E, Jung W, Anagnostakos K. In vivo and in vitro studies of antibiotic release from and bacterial growth inhibition by antibiotic-impregnated polymethylmethacrylate hip spacers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Jan;50(1):332-5. doi: 10.1128/AAC.50.1.332-335.2006. PMID: 16377705; PMCID: PMC1346773
138. Kheir MM, Tan TL, Higuera C, George J, Della Valle CJ, Shen M, Parvizi J. Periprosthetic Joint Infections Caused by Enterococci Have Poor Outcomes. *J Arthroplasty.* 2017 Mar;32(3):933-947. doi: 10.1016/j.arth.2016.09.017. Epub 2016 Sep 28. PMID: 27789094
139. Kim S, Bishop AR, Squire MW, Rose WE, Ploeg HL. Mechanical, elution, and antibacterial properties of simplex bone cement loaded with vancomycin. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2020 Mar;103:103588. doi: 10.1016/j.jmbbm.2019.103588. Epub 2019 Dec 16. PMID: 32090917
140. Klement MR, Cunningham DJ, Wooster BM, Wellman SS, Bolognesi MP, Green CL, Garrigues GE. Comparing Standard Versus Extended Culture Duration in Acute Hip and Knee Periprosthetic Joint Infection. *J Am Acad Orthop Surg.* 2019 May 1;27(9):e437-e443. doi: 10.5435/JAAOS-D-17-00674. PMID: 30431505

141. Kluin OS, van der Mei HC, Busscher HJ, Neut D. Biodegradable vs non-biodegradable antibiotic delivery devices in the treatment of osteomyelitis. *Expert Opin Drug Deliv.* 2013 Mar;10(3):341-51. doi: 10.1517/17425247.2013.751371. Epub 2013 Jan 6. PMID: 23289645
142. Kuiper JW, van den Bekerom MP, van der Stappen J, Nolte PA, Colen S. 2-stage revision recommended for treatment of fungal hip and knee prosthetic joint infections. *Acta Orthop.* 2013 Dec;84(6):517-23. doi: 10.3109/17453674.2013.859422. Epub 2013 Oct 31. PMID: 24171675; PMCID: PMC3851663
143. Kurebayashi L, de Melo AT, Andrade-Silva FB, Kojima KE, Silva JDS. CLINICAL EVALUATION OF PATIENTS WITH VANCOMYCIN SPACER RETAINED FOR MORE THAN 12 MONTHS. *Acta Ortop Bras.* 2019 Jan-Feb;27(1):55-58. doi: 10.1590/1413-785220192701213649. PMID: 30774532; PMCID: PMC6362697
144. Lachiewicz PF, Wellman SS, Peterson JR. Antibiotic Cement Spacers for Infected Total Knee Arthroplasties. *J Am Acad Orthop Surg.* 2020 Mar 1;28(5):180-188. doi: 10.5435/JAAOS-D-19-00332. PMID: 31688429
145. Lee SH, Tai CL, Chen SY, Chang CH, Chang YH, Hsieh PH. Elution and Mechanical Strength of Vancomycin-Loaded Bone Cement: In Vitro Study of the Influence of Brand Combination. *PLoS One.* 2016 Nov 17;11(11):e0166545. doi: 10.1371/journal.pone.0166545. PMID: 27855203; PMCID: PMC5113949
146. Letchmanan K, Shen SC, Ng WK, Kingshuk P, Shi Z, Wang W, Tan RBH. Mechanical properties and antibiotic release characteristics of poly(methyl methacrylate)-based bone cement formulated with mesoporous silica nanoparticles. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2017 Aug;72:163-170. doi: 10.1016/j.jmbbm.2017.05.003. Epub 2017 May 2. PMID: 28499164
147. Lewis G, Janna S, Bhattaram A. Influence of the method of blending an antibiotic powder with an acrylic bone cement powder on physical, mechanical, and thermal properties of the cured cement. *Biomaterials.* 2005 Jul;26(20):4317-25. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.11.003. PMID: 15683656

148. Li T, Fu L, Wang J, Shi Z. High dose of vancomycin plus gentamicin incorporated acrylic bone cement decreased the elution of vancomycin. *Infect Drug Resist.* 2019 Jul 18;12:2191-2199. doi: 10.2147/IDR.S203740. PMID: 31410038; PMCID: PMC6645360
149. Lichstein P, Su S, Hedlund H, Suh G, Maloney WJ, Goodman SB, Huddleston JI 3rd. Treatment of Periprosthetic Knee Infection With a Two-stage Protocol Using Static Spacers. *Clin Orthop Relat Res.* 2016 Jan;474(1):120-5. doi: 10.1007/s11999-015-4443-2. PMID: 26280681; PMCID: PMC4686492
150. Liu X., Xie Z., Zhang C., Pan H., Rahaman MN., Zhang X., Fu Q., Huang W. Bioactive borate glass scaffolds: in vitro and in vivo evaluation for use as a drug delivery system in the treatment of bone infection. *J Mater Sci Mater Med.* 2010; (2):575-582
151. Logoluso N, Drago L, Gallazzi E, George DA, Morelli I, Romanò CL. Calcium-Based, Antibiotic-Loaded Bone Substitute as an Implant Coating: A Pilot Clinical Study. *J Bone Jt Infect.* 2016 Oct 1;1:59-64. doi: 10.7150/jbji.17586. PMID: 28529855; PMCID: PMC5423561
152. Luo S, Jiang T, Long L, Yang Y, Yang X, Luo L, Li J, Chen Z, Zou C, Luo S. A dual PMMA/calcium sulfate carrier of vancomycin is more effective than PMMA-vancomycin at inhibiting *Staphylococcus aureus* growth in vitro. *FEBS Open Bio.* 2020 Apr;10(4):552-560. doi: 10.1002/2211-5463.12809. Epub 2020 Mar 11. PMID: 32052585; PMCID: PMC7137790
153. Ma D, Shanks RMQ, Davis CM 3rd, Craft DW, Wood TK, Hamlin BR, Urish KL. Viable bacteria persist on antibiotic spacers following two-stage revision for periprosthetic joint infection. *J Orthop Res.* 2018 Jan;36(1):452-458. doi: 10.1002/jor.23611. Epub 2017 Jun 28. PMID: 28543707; PMCID: PMC5694702
154. Mabry TM, Hanssen AD. Articulating antibiotic spacers: a matter of personal preference. *Orthopedics.* 2007 Sep;30(9):783-5. doi: 10.3928/01477447-20070901-02. PMID: 17899938
155. Man WY, Monni T, Jenkins R, Roberts P. Post-operative infection with fresh frozen allograft: reported outcomes of a hospital-based bone bank over 14 years.

- Cell Tissue Bank. 2016 Jun;17(2):269-75. doi: 10.1007/s10561-016-9547-8. Epub 2016 Feb 24. PMID: 26910111
156. Masters EA, Trombetta RP, de Mesy Bentley KL, Boyce BF, Gill AL, Gill SR, Nishitani K, Ishikawa M, Morita Y, Ito H, Bello-Irizarry SN, Ninomiya M, Brodell JD Jr, Lee CC, Hao SP, Oh I, Xie C, Awad HA, Daiss JL, Owen JR, Kates SL, Schwarz EM, Muthukrishnan G. Evolving concepts in bone infection: redefining "biofilm", "acute vs. chronic osteomyelitis", "the immune proteome" and "local antibiotic therapy". *Bone Res.* 2019 Jul 15;7:20. doi: 10.1038/s41413-019-0061-z. PMID: 31646012; PMCID: PMC6804538
157. Meehan J, Jamali AA, Nguyen H. Prophylactic antibiotics in hip and knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am.* 2009 Oct;91(10):2480-90. doi: 10.2106/JBJS.H.01219. PMID: 19797586
158. Mensah LM, Love BJ. A meta-analysis of bone cement mediated antibiotic release: Overkill, but a viable approach to eradicate osteomyelitis and other infections tied to open procedures. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2021 Apr;123:111999. doi: 10.1016/j.msec.2021.111999. Epub 2021 Feb 27. PMID: 33812619
159. Mori R, Nakai T, Enomoto K, Uchio Y, Yoshino K. Increased antibiotic release from a bone cement containing bacterial cellulose. *Clin Orthop Relat Res.* 2011 Feb;469(2):600-6. doi: 10.1007/s11999-010-1626-8. Epub 2010 Oct 13. PMID: 20945120; PMCID: PMC3018194
160. Nace J, Siddiqi A, Talmo CT, Chen AF. Diagnosis and Management of Fungal Periprosthetic Joint Infections. *J Am Acad Orthop Surg.* 2019 Sep 15;27(18):e804-e818. doi: 10.5435/JAAOS-D-18-00331. PMID: 30520804
161. Namba RS, Inacio MC, Paxton EW. Risk factors associated with deep surgical site infections after primary total knee arthroplasty: an analysis of 56,216 knees. *J Bone Joint Surg Am.* 2013 May 1;95(9):775-82. doi: 10.2106/JBJS.L.00211. PMID: 23636183
162. Neut D, de Groot EP, Kowalski RS, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. Gentamicin-loaded bone cement with clindamycin or fusidic acid added: biofilm

- formation and antibiotic release. *J Biomed Mater Res A*. 2005 May 1;73(2):165-70. doi: 10.1002/jbm.a.30253. PMID: 15761830
163. Neut D, Dijkstra RJ, Thompson JI, et al. Antibacterial efficacy of a new gentamicin-coating for cementless prostheses compared to gentamicin-loaded bone cement. *J Orthop Res*. 2011;29:1654–1661. doi:10.1002/jor.21433
164. Padilla S, del Real RP, Vallet-Regí M. In vitro release of gentamicin from OHAp/PEMA/PMMA samples. *J Control Release*. 2002 Oct 30;83(3):343-52. doi: 10.1016/s0168-3659(02)00168-2. PMID: 12387943
165. Palmer RJ Jr, Stoodley P. Biofilms 2007: broadened horizons and new emphases. *J Bacteriol*. 2007 Nov;189(22):7948-60. doi: 10.1128/JB.00787-07. Epub 2007 Aug 31. PMID: 17766421; PMCID: PMC2168691
166. Panteli M, Giannoudis PV. Chronic osteomyelitis: what the surgeon needs to know. *EFORT Open Rev*. 2017 Mar 13;1(5):128-135. doi: 10.1302/2058-5241.1.000017. PMID: 28461939; PMCID: PMC5367612
167. Parent M, Magnaudeix A, Delebassée S, Sarre E, Champion E, Viana Trecant M, Damia C. Hydroxyapatite microporous bioceramics as vancomycin reservoir: Antibacterial efficiency and biocompatibility investigation. *J Biomater Appl*. 2016 Oct;31(4):488-498. doi: 10.1177/0885328216653108. Epub 2016 Jun 8. PMID: 27278782
168. Parikh MS, Antony S. A comprehensive review of the diagnosis and management of prosthetic joint infections in the absence of positive cultures. *J Infect Public Health*. 2016 Sep-Oct;9(5):545-56. doi: 10.1016/j.jiph.2015.12.001. Epub 2016 Jan 29. PMID: 26829893
169. Parvizi J, Adeli B, Zmistowski B, Restrepo C, Greenwald AS. Management of periprosthetic joint infection: the current knowledge: AAOS exhibit selection. *J Bone Joint Surg Am*. 2012 Jul 18;94(14):e104. doi: 10.2106/JBJS.K.01417. PMID: 22810411
170. Penner MJ, Masri BA, Duncan CP. Elution characteristics of vancomycin and tobramycin combined in acrylic bone-cement. *J Arthroplasty*. 1996 Dec;11(8):939-44. doi: 10.1016/s0883-5403(96)80135-5. PMID: 8986572

171. Peretsmanas E.O., Artyukhov A.A., Shtilman M.I., Esin I.V., Zubikov V.S., Gerasimov I.A. Study of elution characteristics of anti-tuberculosis drugs mixed with bone cement // *Tuberculosis and Lung Diseases*. -2021. - V. 99, № 4, 30-35 p. (In Russ.).- DOI: 10.21292/2075-1230-2021-99-4-30-35
172. Pithankuakul K, Samranvedhya W, Visutipol B, Rojviroj S. The effects of different mixing speeds on the elution and strength of high-dose antibiotic-loaded bone cement created with the hand-mixed technique. *J Arthroplasty*. 2015 May;30(5):858-63. doi: 10.1016/j.arth.2014.12.003. Epub 2014 Dec 5. PMID: 25522957
173. Rahman N, Khan R, Badshah S. Effect of x-rays and gamma radiations on the bone mechanical properties: literature review. *Cell Tissue Bank*. 2018 Dec;19(4):457-472. doi: 10.1007/s10561-018-9736-8. Epub 2018 Nov 13. PMID: 30426337
174. Rasyid HN, van der Mei HC, Frijlink HW, Soegijoko S, van Horn JR, Busscher HJ, Neut D. Concepts for increasing gentamicin release from handmade bone cement beads. *Acta Orthop*. 2009 Oct;80(5):508-13. doi: 10.3109/17453670903389782. PMID: 19916680; PMCID: PMC2823325
175. Reilly SS, Hudson MC, Kellam JF, Ramp WK. In vivo internalization of *Staphylococcus aureus* by embryonic chick osteoblasts. *Bone*. 2000 Jan;26(1):63-70. doi: 10.1016/s8756-3282(99)00239-2. PMID: 10617158
176. Ridgeway S, Wilson J, Charlet A, Kafatos G, Pearson A, Coello R. Infection of the surgical site after arthroplasty of the hip. *J Bone Joint Surg Br*. 2005 Jun;87(6):844-50. doi: 10.1302/0301-620X.87B6.15121. PMID: 15911671
177. Rodríguez-Pardo D, Pigrau C, Lora-Tamayo J, Soriano A, del Toro MD, Cobo J, Palomino J, Euba G, Riera M, Sánchez-Somolinos M, Benito N, Fernández-Sampedro M, Sorli L, Guio L, Iribarren JA, Baraia-Etxaburu JM, Ramos A, Bahamonde A, Flores-Sánchez X, Corona PS, Ariza J; REIPI Group for the Study of Prosthetic Infection. Gram-negative prosthetic joint infection: outcome of a debridement, antibiotics and implant retention approach. A large multicentre study. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Nov;20(11):O911-9. doi: 10.1111/1469-0691.12649. Epub 2014 Jun 14. PMID: 24766536

178. Romanò C.L., Bozhkova S., Artyukh V., Romanò D., Tsuchiya H., Drago L. Local antibacterial implant protection in orthopedics and trauma: what's new? // Травматология и ортопедия России. 2019. №4. С. 64-74
179. Romanò CL, Scarponi S, Gallazzi E, Romanò D, Drago L. Antibacterial coating of implants in orthopaedics and trauma: a classification proposal in an evolving panorama. *J Orthop Surg Res.* 2015 Oct 1;10:157. doi: 10.1186/s13018-015-0294-5. PMID: 26429342; PMCID: PMC4591707
180. Sa Y, Yang F, Wang Y, Wolke JGC, Jansen JA. Modifications of Poly(Methyl Methacrylate) Cement for Application in Orthopedic Surgery. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1078:119-134. doi: 10.1007/978-981-13-0950-2_7. PMID: 30357621
181. Schäfer P, Fink B, Sandow D, Margull A, Berger I, Frommelt L. Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy. *Clin Infect Dis.* 2008 Dec 1;47(11):1403-9. doi: 10.1086/592973. PMID: 18937579
182. Schiavone Panni A, Corona K, Giulianelli M, Mazzitelli G, Del Regno C, Vasso M. Antibiotic-loaded bone cement reduces risk of infections in primary total knee arthroplasty? A systematic review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2016 Oct;24(10):3168-3174. doi: 10.1007/s00167-016-4301-0. Epub 2016 Sep 6. PMID: 27600633.
183. Schiefer UR, Heiss C, Dingeldein E, Wenisch S, Schnettler R, Kilian O. In-vitro-Untersuchungen zu Elutionskinetiken und antimikrobiellen Wirkungen von Gentamicin- und Clindamycin-haltigen Knochenzementen [Elution kinetics and antimicrobial effects of gentamicin- and clindamycin-loaded bone cements in vitro]. *Z Orthop Unfall.* 2008 Jan-Feb;146(1):92-8. German. doi: 10.1055/s-2007-989301. PMID: 18324589
184. Schnieders J, Gbureck U, Thull R, Kissel T. Controlled release of gentamicin from calcium phosphate-poly(lactic acid-co-glycolic acid) composite bone cement. *Biomaterials.* 2006 Aug;27(23):4239-49. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.03.032. Epub 2006 Apr 18. PMID: 16620958
185. Schwarz EM, McLaren AC, Sculco TP, Brause B, Bostrom M, Kates SL, Parvizi J, Alt V, Arnold WV, Carli A, Chen AF, Choe H, Coraça-Huber DC, Cross M, Ghert

- M, Hickok N, Jennings JA, Joshi M, Metsemakers WJ, Ninomiya M, Nishitani K, Oh I, Padgett D, Ricciardi B, Saeed K, Sendi P, Springer B, Stoodley P, Wenke JC; Hospital for Special Surgery 2019 Biofilm Symposium Workgroup. Adjuvant antibiotic-loaded bone cement: Concerns with current use and research to make it work. *J Orthop Res.* 2021 Feb;39(2):227-239. doi: 10.1002/jor.24616. Epub 2020 Mar 2. PMID: 31997412; PMCID: PMC7390691
186. Schwotzer N, Wahl P, Fracheboud D, Gautier E, Chuard C. Optimal culture incubation time in orthopedic device-associated infections: a retrospective analysis of prolonged 14-day incubation. *J Clin Microbiol.* 2014 Jan;52(1):61-6. doi: 10.1128/JCM.01766-13. Epub 2013 Oct 23. PMID: 24153117; PMCID: PMC3911454
187. Shen SC, Letchmanan K, Chow PS, Tan RBH. Antibiotic elution and mechanical property of TiO₂ nanotubes functionalized PMMA-based bone cements. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2019 Mar;91:91-98. doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.11.020. Epub 2018 Nov 23. PMID: 30550989
188. Shinsako K, Okui Y, Matsuda Y, Kunimasa J, Otsuka M. Effects of bead size and polymerization in PMMA bone cement on vancomycin release. *Biomed Mater Eng.* 2008;18(6):377-85. doi: 10.3233/BME-2008-0554. PMID: 19197114
189. Shirtliff ME, Mader JT, Camper AK. Molecular interactions in biofilms. *Chem Biol.* 2002 Aug;9(8):859-71. doi: 10.1016/s1074-5521(02)00198-9. PMID: 12204685
190. Slane J, Gietman B, Squire M. Antibiotic elution from acrylic bone cement loaded with high doses of tobramycin and vancomycin. *J Orthop Res.* 2018;36:1078–1085. doi:10.1002/jor.23722
191. Slane JA, Vivanco JF, Rose WE, Squire MW, Ploeg HL. The influence of low concentrations of a water soluble poragen on the material properties, antibiotic release, and biofilm inhibition of an acrylic bone cement. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014 Sep;42:168-76. doi: 10.1016/j.msec.2014.05.026. Epub 2014 May 22. PMID: 25063107
192. Soundrapandian C, Basu D, Sa B, Datta S. Local drug delivery system for the treatment of osteomyelitis: In vitro evaluation. *Drug Dev Ind Pharm.* 2011

- May;37(5):538-46. doi: 10.3109/03639045.2010.528427. Epub 2010 Dec 3. PMID: 21126218
193. Struelens B, Claes S, Bellemans J. Spacer-related problems in two-stage revision knee arthroplasty. *Acta Orthop Belg.* 2013 Aug;79(4):422-6. PMID: 24205773
194. Struthers JK. The use of a continuous culture system to study the antimicrobial susceptibility of bacteria in biofilm. *Methods Mol Med.* 2001;48:215-25. doi: 10.1385/1-59259-077-2:215. PMID: 21374421
195. Swearingen MC, Granger JF, Sullivan A, Stoodley P. Elution of antibiotics from poly(methyl methacrylate) bone cement after extended implantation does not necessarily clear the infection despite susceptibility of the clinical isolates. *Pathog Dis.* 2016 Feb;74(1):ftv103. doi: 10.1093/femspd/ftv103. Epub 2015 Nov 1. PMID: 26527622; PMCID: PMC4882083
196. Tan HL, Ao HY, Ma R, Lin WT, Tang TT. In vivo effect of quaternized chitosan-loaded polymethylmethacrylate bone cement on methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* infection of the tibial metaphysis in a rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Oct;58(10):6016-23. doi: 10.1128/AAC.03489-14. Epub 2014 Jul 28. PMID: 25070107; PMCID: PMC4187961
197. Tande A.J., Patel R. Prosthetic joint infection // *Clin. Microbiol. Rev.* 2014. Vol. 27, No 2. P. 302-345. DOI: 10.1128/CMR.00111-13
198. Temenoff JS, Mikos AG. Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials.* 2000 Dec;21(23):2405-12. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00108-3. PMID: 11055288
199. Tiemann A, Hofmann GO, Krukemeyer MG, Krenn V, Langwald S. Histopathological Osteomyelitis Evaluation Score (HOES) - an innovative approach to histopathological diagnostics and scoring of osteomyelitis. *GMS Interdiscip Plast Reconstr Surg DGPW.* 2014 Oct 20;3:Doc08. doi: 10.3205/iprs000049. PMID: 26504719; PMCID: PMC4582515

200. Toms AD, Davidson D, Masri BA, Duncan CP. The management of peri-prosthetic infection in total joint arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br.* 2006 Feb;88(2):149-55. doi: 10.1302/0301-620X.88B2.17058. PMID: 16434514
201. Tsai Y, Chang CH, Lin YC, Lee SH, Hsieh PH, Chang Y. Different microbiological profiles between hip and knee prosthetic joint infections. *J Orthop Surg (Hong Kong).* 2019 May-Aug;27(2):2309499019847768. doi: 10.1177/2309499019847768. PMID: 31117922
202. Tunney MM, Dunne N, Einarsson G, McDowell A, Kerr A, Patrick S. Biofilm formation by bacteria isolated from retrieved failed prosthetic hip implants in an in vitro model of hip arthroplasty antibiotic prophylaxis. *J Orthop Res.* 2007 Jan;25(1):2-10. doi: 10.1002/jor.20298. PMID: 17001707
203. Uchiyama K, Takahira N, Fukushima K, Moriya M, Yamamoto T, Minegishi Y, Sakai R, Itoman M, Takaso M. Two-stage revision total hip arthroplasty for periprosthetic infections using antibiotic-impregnated cement spacers of various types and materials. *ScientificWorldJournal.* 2013 Dec 7;2013:147248. doi: 10.1155/2013/147248. PMID: 24381509; PMCID: PMC3871498
204. Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *J Polym Sci B Polym Phys.* 2011 Jun 15;49(12):832-864. doi: 10.1002/polb.22259. PMID: 21769165; PMCID: PMC3136871
205. Urabe K, Naruse K, Hattori H, Hirano M, Uchida K, Onuma K, Park HJ, Itoman M. In vitro comparison of elution characteristics of vancomycin from calcium phosphate cement and polymethylmethacrylate. *J Orthop Sci.* 2009 Nov;14(6):784-93. doi: 10.1007/s00776-009-1397-9. Epub 2009 Dec 8. PMID: 19997827
206. van de Belt H, Neut D, Uges DR, et al. Surface roughness, porosity and wettability of gentamicin-loaded bone cements and their antibiotic release. *Biomaterials.* 2000;21:1981–1987
207. Van Erp JHJ, Heineken AC, Van Wensen RJA, Van Kempen RWTM, Hendriks JGE, Wegdam-Blans M, Fonville JM, Van Der Steen MCM. Optimization of the empirical antibiotic choice during the treatment of acute prosthetic joint infections: a retrospective analysis of 91 patients. *Acta Orthop.* 2019 Oct;90(5):455-459. doi:

10.1080/17453674.2019.1621595. Epub 2019 May 28. PMID: 31132902; PMCID: PMC6746268

208. Van Thiel GS, Berend KR, Klein GR, Gordon AC, Lombardi AV, Della Valle CJ. Intraoperative molds to create an articulating spacer for the infected knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res.* 2011 Apr;469(4):994-1001. doi: 10.1007/s11999-010-1644-6. PMID: 21042896; PMCID: PMC3048265
209. van Vugt TAG, Arts JJ, Geurts JAP. Antibiotic-Loaded Polymethylmethacrylate Beads and Spacers in Treatment of Orthopedic Infections and the Role of Biofilm Formation. *Front Microbiol.* 2019 Jul 25;10:1626. doi: 10.3389/fmicb.2019.01626. PMID: 31402901; PMCID: PMC6671866
210. Vanhegan IS, Malik AK, Jayakumar P, Ul Islam S, Haddad FS. A financial analysis of revision hip arthroplasty: the economic burden in relation to the national tariff. *J Bone Joint Surg Br.* 2012 May;94(5):619-23. doi: 10.1302/0301-620X.94B5.27073. PMID: 22529080
211. Voleti PB, Baldwin KD, Lee GC. Use of static or articulating spacers for infection following total knee arthroplasty: a systematic literature review. *J Bone Joint Surg Am.* 2013 Sep 4;95(17):1594-9. doi: 10.2106/JBJS.L.01461. PMID: 24005200
212. Wall V, Nguyen TH, Nguyen N, Tran PA. Controlling Antibiotic Release from Polymethylmethacrylate Bone Cement. *Biomedicines.* 2021 Jan 1;9(1):26. doi: 10.3390/biomedicines9010026. PMID: 33401484; PMCID: PMC7824110
213. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater.* 2017 Jun 7;2(4):224-247. doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.05.007. PMID: 29744432; PMCID: PMC5935655
214. Winkler H, Haiden P. Allograft Bone as Antibiotic Carrier. *J Bone Jt Infect.* 2017 Jan 1;2(1):52-62. doi: 10.7150/jbji.17466. PMID: 28529864; PMCID: PMC5423575
215. Winkler H, Stoiber A, Kaudela K, Winter F, Menschik F. One stage uncemented revision of infected total hip replacement using cancellous allograft bone impregnated with antibiotics. *J Bone Joint Surg Br.* 2008 Dec;90(12):1580-4. doi: 10.1302/0301-620X.90B12.20742. PMID: 19043128

216. Winkler H. Rationale for one stage exchange of infected hip replacement using uncemented implants and antibiotic impregnated bone graft. *Int J Med Sci.* 2009 Sep 4;6(5):247-52. doi: 10.7150/ijms.6.247. PMID: 19834590; PMCID: PMC2755120
217. Yan S, Cai X, Yan W, Dai X, Wu H. Continuous wave ultrasound enhances vancomycin release and antimicrobial efficacy of antibiotic-loaded acrylic bone cement in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007 Jul;82(1):57-64. doi: 10.1002/jbm.b.30705. PMID: 17078078
218. Zhang X, Jia W, Gu Y, et al. Teicoplanin-loaded borate bioactive glass implants for treating chronic bone infection in a rabbit tibia osteomyelitis model. *Biomaterials* 2010;31:5865-74