

На правах рукописи

Меликова  
Регина Энверпашаевна

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

3.1.8 - Травматология и ортопедия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2023

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

**Научный руководитель:**

Кандидат медицинских наук

**Цискарашвили Арчил Важаевич**

**Официальные оппоненты:**

**Божкова Светлана Анатольевна** – доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Р.Р. Вредена» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая научным отделением профилактики и лечения раневой инфекции.

**Митрофанов Вячеслав Николаевич** – кандидат медицинских наук, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, заместитель директора Университетской клиники по хирургии.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 21.1.041.01 на базе ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» Минздрава России по адресу: 127299, г. Москва, ул. Приорова, 10.

С диссертацией можно ознакомиться в ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» Минздрава России по адресу: г. Москва, ул. Приорова, 10 и на сайте организации <https://www.cito-priorov.ru/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.м.н.

**Казьмин Аркадий Иванович**

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы диссертационного исследования

Хронический остеомиелит и перипротезная инфекция, как составляющие ортопедической инфекции, являются грозным и разрушительным осложнением. Частота встречаемости костно-суставной инфекции ежегодно растет, что связано с увеличением числа тяжелой механической травмы, хирургической активности, расширением показаний к проведению операций по замене суставов, а также ятрогенными дефектами лечения [Гараев с М.Р. соавт., 2019, Цискарашвили А.В. с соавт., 2018, Цискарашвили А.В. с соавт. 2020]. Доля хронического остеомиелита составляет 3–25 % от всех заболеваний опорно-двигательной системы [Ерофеев С.А. с соавт., 2013], доля перипротезной инфекции после первичной операции – 0,3–2,4 % [М.С. Virt et al., 2016], после ревизионного эндопротезирования – 6–8 % [Божкова С.А. с соавт., 2014].

Основным методом лечения хронического остеомиелита длинных костей и перипротезной инфекции суставов является тщательная хирургическая санация очага с удалением нежизнеспособных 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 (ПММА) [van Vugt TAG. et al., 2019, Dusane DH et al., 2017, Galvez-Lopez R et al., 2014], несомненным достоинством которого считается механическая прочность. Однако ряд имеющихся недостатков такие как: высокая токсичность летучих паров метилметакрилата [Кондратьев В.М. с соавт., 2013]; высокая температура реакции полимеризации, ограничивающая спектр антибиотиков, возможных для импрегнации, а также способной вызвать некроз костной и мягкотканых структур на этапе имплантации [Wall V. et al., 2021]; гидрофобная поверхность, не

препятствующая адгезии микроорганизмов к своей поверхности и формированию ими микробных биопленок; элюция до 10 % препарата от его общего импрегнированного объема [Luo S. et al., 2020]; неравномерное распределение антибиотиков в цементной матрице, приводящее к неравномерному высвобождению загруженного противомикробного агента; изменение гарантийных свойств при ручном смешивании компонентов цемента [Цискарашвили А.В. с соавт., 2022]; необходимость повторной операции по его удалению, сопровождающаяся дополнительной травматизацией и потерей костной и мягких тканей [Божкова С.А. с соавт., 2015, Kurebayashi L. et al., 2019]; содержание в составе цемента рентгеноконтрастных агентов индуцирующих высвобождение провоспалительных цитокинов, вызывающих остеолитическую реакцию тканей, которая в последствии приводит к дестабилизации имплантата [Giavaresi G et al., 2012], - не позволяют считать его оптимальной локальной транспортной системой.

Несмотря на совершенствование оперативных методик, и возможность влиять на порогенность ПММА, частота рецидивов при применении цементной матрицы по-прежнему сохраняется на высоком уровне, колеблясь в пределах от 6,3 до 38,9 % [Куковенко Г.А. с соавт., 2019, Кавалерский Г.М. с соавт., 2014, Леонова С.Н. с соавт., 2019, Курмангалиев Е-Д. Т., 2018, Одарченко Д.И., 2013, Ермаков А.М. с соавт., 2018, Uchiyama K. et al., 2013, Toms A.D. et al., 2006].

Таким образом, актуальность проблем, связанных с ПММА, 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 оптимальной локальной транспортной системе.

**Цель исследования:** изучить в *in vitro* условиях элюционные и антибактериальные свойства полимерного гидрогеля, 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 (ПВС), 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 антибиотиками 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 позволит 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. Биodeградируемость 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 изучении основных свойств, характеристик и эффективности применения полимерного гидрогеля, импрегнированного 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. Имплантирование 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 опубликованы 4 печатные работы, в том числе 2 статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации научных результатов диссертационных исследований, 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.

Полимерные гидрогели имеют достаточные перспективы успешного применения в клинической практике при лечении гнойно-воспалительных ран и инфекционных осложнений не только в травматологии-ортопедии и гнойной хирургии, но и других патологий. Гидрогелевую депо-матрицу можно будет использовать и при лечении ППИ, путем заполнения костномозгового канала костей, образующих суставы, с последующей установкой спейсера или эндопротеза, что позволит усилить местную антибактериальную терапию и снизить процент неудовлетворительных исходов лечения. Помимо всего, полимерный гидрогель можно будет использовать и в целях профилактики предупреждения развития инфекционных осложнений после выполненных оперативных вмешательств.

### **Объем и структура диссертации**

Материалы диссертационного исследования представлены на 198 страницах. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 3-х глав,

заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа содержит 9 таблиц и 126 рисунков. Список литературы включает 218 источников: из них 70 – отечественных и 148 – иностранных авторов.

**Содержание работы:** Выполненное диссертационное исследование носит экспериментальный характер и включает в себя 3 последовательных этапа: 1. *in vitro* исследование свойств полимерного гидрогеля на основе ненасыщенных производных поливинилового спирта, импрегнированного разными группами антибиотиков, обладающими различными физико-химическими профилями; 2. *in vitro* изучение антибактериальной активности полимерного гидрогеля, насыщенного разными группами антибиотиков, в отношении ведущих возбудителей ортопедической инфекции; 3. *in vivo* исследование эффективности биодеградируемого полимерного гидрогеля, содержащего антибактериальный препарат, при лечении хронического остеомиелита большеберцовой кости на модели кроликов. На каждом этапе сравнение производилось с костным цементом, насыщенным теми же видами антибиотиков и в той же дозировке, что и полимерный гидрогель.

В ходе 1 этапа изучены максимально допустимые дозы различных групп импрегнируемых антибактериальных агентов на 5 мл материала, при которых бы не менялся модуль упругости гидрогеля. Модуль сдвига полимерных гидрогелей определяли методом пенетрации сферического индентора. 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  $h$  ( $h = h_0 + bf^{2/3}$ , где коэффициент  $b$  зависит от модуля сдвига  $G$  и радиуса шарика  $R$  как  $b = [3/(16GR^{1/2})]^{2/3}$ ). 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. Анализ полученных экспериментальных значений осуществляли решением контактной задачи теории упругости.

Как видно из таблицы 1, 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/см<sup>3</sup>. Аналогичные результаты зафиксированы и у ПММА, где условием являлось получение отвержденного монолитного блока цемента.

Таблица 1.

Влияние концентрации импрегнируемого в композицию антибиотика на процесс формирования образцов

Антибиотик	Концентрация мг/см <sup>3</sup>	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

Полученные результаты насыщения исследуемых матриц позволяют констатировать, что объемы антибиотиков, которые могут быть импрегнированы в оба типа материалов, сопоставимы.

Количественное определение биологически активных веществ в растворах осуществляли с помощью спектрофотометрического метода, позволяющего получить зависимости оптической плотности растворов от концентрации антибиотиков. Динамику элюции импрегнированных лекарственных препаратов из объема образцов изучали в статических условиях. Образцы-цилиндры объемом 5 см<sup>3</sup>, насыщенные антибиотиком, помещали в фосфатный буферный раствор в соотношении 1:10 и инкубировали при 37 °С. Замену физиологического раствора осуществляли через 1 час, 1, 3, 7, 14 и 28 дней. Измеряя интенсивность поглощения при характерной длине волны по предварительно построенным для каждого препарата (ванкомицин, рифампицин, цефазолин) зависимостям интенсивности поглощения от концентрации, определяли его содержание в физиологическом растворе. С целью получения достоверных данных параллельно изучались не менее 5 образцов каждого состава. Полученные результаты 5 параллельных исследований высвобождения препаратов из костного цемента и полимерного гидрогеля представлены в виде средних значений (Me) и 95% ДИ в таблицах 2 и 3 соответственно.

Таблица 2.

Концентрации антибиотиков, высвобожденные из цементных образцов в контрольные дни исследования

Вре мя, дни	Концентрация препарата, мг/л								
	Me (95% ДИ)								
	Ванкомицин			Цефазолин			Рифампицин		
	40 мг/см <sup>3</sup>	60 мг/см <sup>3</sup>	80 мг/см <sup>3</sup>	20 мг/см <sup>3</sup>	40 мг/см <sup>3</sup>	60 мг/см <sup>3</sup>	20 мг/см <sup>3</sup>	40 мг/см <sup>3</sup>	60 мг/см <sup>3</sup>
1	264 (255;273 )	373 (361;38 5)	433 (414;4 52)	111 (106;11 6)	212 (202;22 2)	294 (276;31 2)	160 (158;1 62)	282 (265;2 99)	372 (342;4 02)

3	79,6 (75,6; 83,6)	102,6 (95,2; 110)	129,4 (122,5; 136,3)	29 (28,5;2 9,5)	52,4 (51,8;5 3)	71 (66,8;7 5,2)	29 (28,5;2 9,5)	43,2 (40,5; 45,9)	67,4 (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 <sup>3</sup>	60 мг/см <sup>3</sup>	80 мг/см <sup>3</sup>	20 мг/см <sup>3</sup>	40 мг/см <sup>3</sup>	60 мг/см <sup>3</sup>	20 мг/см <sup>3</sup>	40 мг/см <sup>3</sup>	60 мг/см <sup>3</sup>
1	1613 (1556; 1670)	2491 (2391; 2591)	3235 (3010; 3460)	933 (868; 998)	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; 2060)	407 (388; 426)	833 (755;9 11)	1060 (974;1 146)	408 (386;4 30)	826 (783;8 69)	1090 (1047; 1133)
7	124	176	224	184	402	634	180	395	622

	(115;1 33)	(168;1 85)	(214;2 34)	(177; 191)	(388;4 16)	(593;6 75)	(164;1 96)	(377;4 13)	(586;6 58)
14	61 (57;65)	101 (97;10 5)	132 (129;1 35)	86 (80;9 2)	142 (135;1 49)	218 (204;2 32)	88 (86;90 )	135 (130;1 40)	224 (219;2 29)
21	42 (40;44)	63 (57;69)	78 (75;81)	68 (64;7 2)	94 (91;97)	127 (122;1 32)	66 (64;68 )	89 (86;92)	129 (126;1 32)
28	32 (30;34)	45 (42;48)	54 (51;57)	44 (41;4 7)	66 (62;70)	77 (75;79)	43 (41;45 )	64 (62;66)	78 (72;84)

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. Элюция импрегнированного препарата осуществлялась в основном с поверхностных слоев ПММА (порядка 2-3 мм). При этом, 80 % агента от этой элюированной доли высвободилось в первые несколько дней исследования. С 2 суток наблюдается резкое снижение на порядок и более скорости элюции препарата из костного цемента. В силу этого для многих использованных концентраций к 2 неделе исследования в растворе регистрируются уровни противомикробного агента ниже минимальных подавляющих концентраций (МПК) в отношении большинства возбудителей ортопедической инфекции.

Полимерные гидрогели продемонстрировали иную картину элюции включенных антибиотиков. Все образцы характеризовались высвобождением на порядок большего количества импрегнируемого препарата, составившее более 70 %. Несмотря на то, что, как и в случае ПММА, наблюдалось взрывное высвобождение, и большая доля лекарственного агента элюировала в первые 5-7 суток исследования, уровни препарата, высвобожденного в раствор, из гидрогелевых образцов были существенно выше и превышали МПК в течение

всего периода исследования (табл. 3). Обращала на себя внимание и различная скорость высвобождения импрегнированных антибиотиков из изучаемых материалов. К примеру, для ванкомицина в случае гидрогелей скорость элюции 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. Сходная картина наблюдалась и для рифампицина и цефазолина, высвобожденных из полимерного гидрогеля.

Вторым этапом микробиологическим методом изучали антимикробную активность образцов-цилиндров на основе полимерного гидрогеля и костного цемента, импрегнированных антибиотиками, обладающими разной молекулярной массой и биохимическими свойствами, в отношении ведущих возбудителей ортопедической инфекции. Было проанализировано бактерицидное действие следующих пар «микроб-антибиотик»: *MSSA* – гентамицин, *MRSA* – ванкомицин, *MSSE* – цефазолин, *MRSE* – ванкомицин и *A. baumannii* – тобрамицин. Все тестируемые штаммы микроорганизмов были высокочувствительны к выбранным антибиотикам. Изучаемые образцы подвергались ежедневному перекладыванию в новые заранее подготовленные чашки Петри с инфицированным агаром Мюллера-Хинтона. Замер диаметра подавления роста 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. Для повышения результатов достоверности каждая пара «микроб-антибиотик» исследовалась в 3 параллельных пробах. Значения всех пар «микроб-антибиотик», полученных от 3 параллельных исследований, представлены в виде среднеарифметических значений в таблице 4. Статистические данные достоверности различий диаметров зон подавления вокруг полимерного гидрогеля и костного цемента продемонстрированы в таблице 5.

Таблица 4.

Среднеарифметические значения диаметров зон задержки роста для каждой пары «микроб-антибиотик»

патоген --- антибиотик	Диаметр зоны ингибирования в мм по суткам*									
	Полимерный гидрогель					Костный цемент (ПММА)				
	1	2	3	6	7	1	2	3	6	7
<i>MSSA</i> <i>Гентамицин</i>	13,6	12	10	10,3	8,7	8	4,3	4,3	4,7	2,7
<i>MRSA</i> <i>Ванкомицин</i>	10	10,3	9	8,7	7,7	5,3	3	1,7	1,7	0,3
<i>MSSE</i> <i>Цефазолин</i>	27,3	27,7	29,3	25,7	23,7	22,3	12	16	15	13
<i>MRSE</i> <i>Ванкомицин</i>	12,7	12,3	11	12,3	9,3	6,3	3,7	1,7	1,7	0,3
<i>A. baumannii</i> <i>Тобрамицин</i>	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)

Все гидрогелевые образцы, содержащие ванкомицин, цефазолин, гентамицин и тобрамицин, в отличие от ПММА показали продолжительную (более 1 недели) эффективную бактерицидную активность в отношении тестируемых возбудителей ортопедической инфекции. Постепенное равномерное сокращение диаметров зон подавления тест-культур вокруг полимерного гидрогеля на 1-2 мм в течение всего периода исследования

косвенно свидетельствовало о контролируемом диффузном высвобождении антибиотиков из гидрогелевой матрицы. Проведенный анализ показал, что противомикробное действие полимерного гидрогеля уже с первых суток исследования достоверно ( $p=0,002$ ) выше бактерицидности костного цемента (табл. 5). К концу наблюдения диаметр зоны подавления вокруг гидрогеля был в 4 и более раза выше ( $p=0,001$ ) по сравнению с ПММА. Более того, антимикробная активность гидрогелевой матрицы в течение всего периода исследования была равномерной и убывала без значимых изменений. В случае ПММА на 2 сутки исследования отмечалось достоверное ( $p=0,042$ ) резкое снижение бактерицидности, при этом зона задержки роста бактерий была неравномерной практически во всех случаях, кроме образцов с цефазолином. Вокруг последних к концу исследования, несмотря на продолжающуюся элюцию и эффективное подавление тест-культур, в зоне ингибиции наблюдался вторичный рост микроорганизмов, что указывает на приобретение бактериями резистентности к данному препарату. Таким образом, результаты микробиологического исследования подтвердили данные, полученные на 1 этапе исследования.

На третьем этапе в *in vivo* эксперименте была воспроизведена модель хронического остеомиелита большеберцовой кости кролика, индуцированная *MSSA*, высокочувствительным к цефазолину. В качестве образца использована модель, описанная в Патенте № 2622209 РФ [Конев В.А. с соавт., 2016], заключающаяся в создании бором трепанационного отверстия диаметром 5 мм округлой формы в проксимальном отделе большеберцовой кости, в которое помещали заранее заготовленную, соответствующую размеру костного дефекта, стерильную гемостатическую губку и пропитывали ее 1,5 мл суточной микробной взвеси, с последующим укрытием посттрепанационного дефекта подлежащими тканями, послойным ушиванием раны и дальнейшим наблюдением в течение 21 дня. Всего в исследовании участвовало 25 половозрелых кроликов-самцов породы Шиншилла. По достижении клинико-лабораторной и рентгенологической картины хронического остеомиелита все

животные, случайно разделенные на 3 группы, подверглись хирургической санации большеберцовой кости. Опытной группе (n=11) после санации в костномозговой канал имплантировали полимерный гидрогель, импрегнированный цефазолином, сравнительной (n=11) – солитарный костный цемент, насыщенный тем же антибиотиком, контрольной группе (n=3), которая служила в качестве наблюдения, имплантация материала не производилась. В последнем случае вместо местной антибиотикотерапии применяли системную внутримышечным введением цефазолина в дозировке 30 мг/кг 3 раза в сутки до момента полного заживления послеоперационной раны. Далее в послеоперационном периоде в динамике изучали локальный статус, общее состояние животных, показатели крови (гемоглобин (Hb), лейкоциты (WBC), СОЭ и С-реактивный белок (СРБ)) и микрофлору отделяемого ран. Животных выводили поэтапно на 15, 30 и 45 сутки. В день вывода выполняли рентгеновские снимки оперированной голени, бактериологический посев биоптатов с последующим гистоморфометрическим исследованием изъятых материалов.

Морфометрическую оценку инфекционно-воспалительного процесса на гистологических препаратах осуществляли с помощью шкалы HOES (Histopathological Osteomyelitis Evaluation Score), которая включает в себя градуированную полуколичественную и аддитивную форму оценки критериев острого (от А1 до А3) и хронического остеомиелита (С1 и С2), где каждый критерий в зависимости от степени выраженности оценивался от 0 до 3 баллов. Эффективность лечения хронического остеомиелита оценивали в комплексе с полученными результатами всех исследований.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение ( $\mu \pm Sd$ ). Достоверность выявляли U-критерием Манна-Уитни. Значимые отличия гистоморфометрических данных определяли непараметрическим U-критерием Манна-Уитни и критерием 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  $p < 0,05$ . В отношении контрольной группы применена описательная статистика.

Экспериментальное исследование показало, что во всех случаях при имплантации гидрогеля клинически наблюдалось своевременное заживление послеоперационной раны. В сравнительной группе, начиная с 7 суток исследования, у 6 (54,5 %) кроликов локальная терапия потребовала вспомогательного системного введения цефазолина в дозировке 30 мг/кг 3 раза в сутки, и у 3 (27,3 %) животных с 21 суток, по причине сохранения признаков воспаления в области оперативного вмешательства, потребовалось увеличение дозировки препарата до 40 мг/кг 3 раза в сутки. Однако, несмотря на усиленную вспомогательную терапию, у 1 (9,1 %) кролика с имплантированным ПММА 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, примененное лечение хронического остеомиелита оказалось неэффективным - на всех сроках наблюдения в области оперативного вмешательства отмечали те или иные клинические признаки воспаления. Помимо всего, достоверное ( $p=0,006$ ) увеличение с 28 суток исследования массы тела животных, которым был имплантирован полимерный гидрогель, по сравнению с группой, где применен ПММА, косвенно свидетельствует о быстром послеоперационном восстановлении общего состояния кроликов опытной группы.

Полученные данные лабораторных показателей крови, представленные в таблицах 6 и 7, соответствовали клинической картине. Первые достоверные различия результатов снижения уровней маркеров воспаления между опытной и сравнительной группами наметились в случае WBC ( $p=0,040$ ) к 14 суткам, в случае СРБ ( $p=0,040$ ) - к 21 суткам. В сравнительной группе в 27,3 % случаев 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 данной группе в среднем наблюдалось снижение уровня маркеров воспаления, однако оно не было столь эффективным, как в опытной группе. В контрольной группе после некоторого снижения значений WBC и СРБ отмечено резкое 2-кратное повышение их уровней к концу исследования, что указывает на обострение хронического остеомиелита. В отношении остальных показателей крови (СОЭ и Hb) достоверных межгрупповых различий в нашем исследовании не выявлено.

Таблица 6.

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

День	Опытная группа				Сравнительная группа			
	Hb (N=110-136)	WBC (N=2,5-6,9)	СОЭ (N=1-4)	СРБ (N=0-1)	Hb (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 7.

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

Нь	0,478	0,478	0,606	0,297	0,436	0,209	0,053
СОЭ	0,748	0,652	0,332	0,340	0,258	0,097	0,383
WBC	0,478	0,151	0,040	0,024	0,040	0,053	0,011
СРБ	0,116	0,519	0,562	0,040	0,063	0,011	0,011

Микробиологический анализ раневого отделяемого в опытной группе не показал роста микрофлоры. Отрицательные результаты получены и при бактериологическом исследовании биоптатов поэтапно выведенных животных, за исключением одного положительного случая скудного роста *MSSA* из мягкотканого биоптата голени кролика, выведенного на 30 сутки исследования. При этом стоит отметить, что посеы костной ткани и других участков мягкотканых структур, самого гидрогеля, изъятых из костномозгового канала и с поверхности мягких тканей, а также мазка области всего оперативного вмешательства, были отрицательными, что не исключает вероятность контаминации вследствие забора материала или его транспортировки. В сравнительной группе рост искомой культуры идентифицировался на каждом контрольном сроке как из раневого отделяемого (до 45,5 %), так и из образцов материалов животных, выведенных на 15 (9,1 %) и 45 сутки (27,3 %) исследования. В последнем случае обильный рост *MSSA* получен из костного цемента, извлеченного из большеберцовой кости кролика со стойкой клинико-лабораторной ремиссией инфекции. В контрольной группе рост *MSSA* верифицировался у всех животных пока присутствовало раневое отделяемое. Положительный результат также был получен из биоптатов кролика, выведенного на 15 сутки исследования. Посев гнойного детрита, взятого из области инфильтрата голени у кролика, выведенного на 45 сутки исследования, не показал роста микрофлоры, что говорит о наличии культууроотрицательной инфекции.

Рентгенологический анализ показал, что в подавляющем большинстве случаев в сравнительной группе, вне зависимости от того была ли инфекция успешно купирована или нет, и во всех случаях в контрольной группе в

наблюдаемые сроки отмечали признаки продолжающегося хронического остеомиелита 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 посттрепанационные отверстия почти полностью закрылись.

Как показал анализ гистоморфометрического исследования, в обеих группах на 15 сутки после имплантации полимерного гидрогеля и ПММА наблюдались признаки репаративного остеогенеза на фоне различной степени выраженности воспаления. Если в опытной группе имелись слабые признаки инфильтрации лимфоцитами и большим количеством клеток макрофагального ряда, то в сравнительной группе очаг воспаления занимал обширные поля, выражено инфильтрированных большим количеством лимфоцитов и плазмоцитов, обнаруживаемые и в пространстве между отслоившимися полями цемента. На 30 сутки исследуемые группы по-прежнему значимо отличались степенью выраженности воспаления в костной ткани. В опытной группе процесс остеорепарации продолжался на фоне достоверно ( $p=0,002$ ) затихающего воспаления. Фрагменты гидрогеля продолжали резорбироваться гигантскими клетками. 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, которая проявилась материал-ассоциированной резорбцией новообразованной костной ткани, особенно выраженной на границе «кость-цемент», и сохранением очагов выраженного лимфоплазмоцитарного инфильтрата вокруг имплантата и между его гранулами и полями. На 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 ( $p=0,002$ ). Площадь воспалительного инфильтрата к данному сроку существенно сократилась по сравнению с 15 сутками и содержала в себе немногочисленные плазмоциты и клетки макрофагального ряда, наличие которых может быть обусловлено реакцией на присутствие инородного тела в виде полимерного гидрогеля, которая нивелируется после полной резорбции материала. Обнаруживаемые остаточные частицы гидрогеля в очаге небольшого воспаления и в просветах сформированных гаверсовых каналов все еще продолжали резорбироваться гигантскими клетками. Одновременно с этим в сравнительной группе наблюдали достоверные ( $p=0,001$ ) признаки обострения остеомиелита, которые проявились усугублением резорбции новообразованной костной ткани более заметной на границе с воспалительным инфильтратом, характеризующимся выраженной инфильтрацией полиморфноядерными нейтрофилами с формированием микроабсцессов. Признаков ремоделирования костной ткани как в опытной группе не наблюдали. В случае контрольной группы гистологическая оценка не показала улучшений ни на одном из контрольных периодов наблюдения. В данной группе 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 этапа инфицирования. Разница заключалась лишь в высокой степени компактизации костного вещества кортикальной стенки с продолжающейся периостальной реакцией и в обнаружении множественных фокусов кровоизлияний, которые к концу исследования выявляли не только в просвете суженного костномозгового канала, но и в кортикальной пластинке.

Гистоморфометрическое исследование показало существенные отличия в опытной группе по сравнению с остальными группами и подтвердило данные других исследований. Опытная группа характеризовалась эффективным постепенным подавлением воспалительного процесса без

нарушения репаративного остеогенеза и не вызывала каких-либо токсических и отрицательных реакций в костной ткани.

Резюмируя итоги каждого этапа исследования, можно утверждать, что биodeградируемые гидрофильные полимерные гидрогели на основе ненасыщенных производных поливинилового спирта могут обеспечивать механизм элюции антибиотиков, полностью основанный на диффузии, и высвобождать высокие эффективные концентрации импрегнированных антибиотиков, способных эффективно подавлять рост микроорганизмов и стойко купировать инфекционно-воспалительный процесс.

## 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 НОЕС, 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 научных работ по теме диссертации

*Статьи в журналах, включенных в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук:*

1. 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. Соколова // Гений ортопедии. 2022. Т. 28, № 6. С. 794-802. DOI: 10.18019/1028-4427-2022-28-6-794-802. EDN RMAAQP
2. 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. doi: 10.18019/1028-4427-2023-29-1-64-70. EDN QXVPBW

*Патент на изобретение:*

3. Способ хирургического лечения гнойно-воспалительных процессов костных и мягкотканых структур опорно-двигательной системы пациента с использованием мягких спейсеров, импрегнированных антибактериальными средствами: пат. 2729025 С1 Рос. Федерация: МПК А61В 17/56, А61М 27/00, А61К 31/7036, 38/14, 47/58, 47,69, А61Р 19/00, 31/04, А61В 6/08, 8/00 / авторы и заявители А.В. Цискарашвили, Р.Э. Меликова; патентообладатель ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» Минздрава России;
4. Способ хирургического лечения гнойно-воспалительных процессов костных и мягкотканых структур опорно-двигательной системы пациента с использованием мягких спейсеров, импрегнированных аминокликозидом и гликопептидом: пат. 2730838 С1 Рос. Федерация: МПК А61В 17/56 / авторы и заявители А.В. Цискарашвили, Р.Э.

Меликова; патентообладатель ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова»  
Минздрава России.