

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФТИЗИОПУЛЬМОНОЛОГИИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Петухова Вероника Витальевна

**ИНГИБИРОВАНИЕ ОСТЕОРЕЗОРБЦИИ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОМ
ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ОСТИТА**

3.1.9. Хирургия

3.3.3. Патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Мушкин Александр Юрьевич

доктор медицинских наук, профессор

Костик Михаил Михайлович

Санкт - Петербург,

2023

Оглавление

Введение	4
Глава 1. ОСТЕОДЕСТРУКЦИЯ И МЕТОДЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ДЕСТРУКТИВНОЙ ПАТОЛОГИИ: ИЗБРАННЫЕ ВОПРОСЫ (обзор литературы)	12
1.1. Туберкулезный остит в структуре хронических очаговых деструктивных заболеваний скелета	12
1.2. Методы регуляции восстановления костной ткани	17
1.3. Применение бисфосфонатов (систематический обзор)	19
Глава 2. Материалы и методы	24
2.1 Общая характеристика материала и методов исследования	24
2.2 Дизайн исследования	25
2.3 Экспериментальная часть исследования	30
2.3.1 Протокол создания экспериментальной модели костного туберкулеза	30
2.3.2 Протокол хирургического вмешательства	32
2.3.3 Постановка внутрикожной пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным	33
2.3.4 Протокол проведения противотуберкулезной терапии	34
2.3.5 Протокол введения бисфосфонатов	34
2.3.6 Период наблюдения, эвтаназия и исследуемые данные (лабораторные, лучевые, морфологические)	35
2.3.7 Статистический анализ	41
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	43
3.1 Клиническая оценка состояния модельных животных	43
3.2 Оценка экспериментальной модели костного туберкулеза	49

3.2.1. Оценка клеточного иммунного ответа на антигены M. tuberculosis	49
3.2.2. Результаты молекулярно - генетического исследования материала из патологических очагов	50
3.3 Оценка динамики массы тела	50
3.4 Оценка динамики лабораторных показателей	51
3.5 Результаты лучевого исследования	53
3.5.1 Результаты исследования интактных бедренных костей	53
3.5.2. Качественные данные	55
3.5.3. Количественные данные	67
3.5.4. Полуколичественная оценка признаков остеорегенерации и остеолизиса	68
3.6 Результаты морфологических и морфометрических исследований	70
3.6.1 Макроскопическая оценка	70
3.6.2 Результаты исследования интактных бедренных костей	72
3.6.3 Результаты исследования экспериментальных препаратов	75
3.6.4 Межгрупповой анализ	101
Заключение	116
Выводы	129
Перспективы дальнейшей разработки темы исследования	130
Список сокращений и условных обозначений	131
Список использованной литературы	132

Введение

Актуальность темы исследования

Костный туберкулез (туберкулезный остит) – частная форма хронического остеомиелита, характеризующаяся развитием очагов специфического воспаления [1] с гематогенным путем инфицирования [20; 93] и первично-хроническим течением [6]. Этиология заболевания полностью изучена и связана исключительно с инфицированием бактериями *M. tuberculosis complex* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii* и *M. caprae*) [120]. В структуре общей заболеваемости туберкулезом в России и в мире на долю внелегочных поражений приходится не более 10% случаев, с преобладанием именно поражений костной ткани [3; 32]. К наиболее частым локализациям туберкулезного остита относят эпиметафизарные отделы длинных трубчатых костей, губчатые кости (особенно позвонки), плоские кости (за исключением костей черепа и лопатки).

Современные методы диагностики туберкулезных оститов основаны на выявлении кислотоустойчивых микобактерий или их ДНК в материале из очагов поражения [35; 42]. В некоторых случаях диагноз устанавливается на основании клинико-лучевой картины, однако в этом случае он трактуется как «установленный, но не доказанный» [145].

Лечение туберкулезной инфекции основано на длительном применении противотуберкулезных препаратов, обладающих бактериостатическим действием [46]. Однако, учитывая характер специфического воспаления (последовательная смена альтеративно-экссудативных и продуктивных процессов с последующей инкапсуляцией очага некроза [1]), а также особенности сосудистой сети костной ткани и относительно медленный кровоток - 2–3 мл крови 100 грамм массы костной ткани в 1 минуту [4],- достижение очага поражения лекарственными препаратами затруднено, ввиду чего при костном туберкулезе наиболее эффективно комплексное лечение, включающее хирургический этап.

Хирургическое лечение костного туберкулеза заключается в проведении радикально-восстановительного вмешательства, где под радикальностью

подразумевается резекция/санация/кюретаж всей пораженной костной ткани, а также склеротически изменённой костной ткани, зачастую окружающей патологический очаг [43]. Восстановительный этап операции направлен с одной стороны, на сохранение анатомической структуры кости, а с другой на улучшение процессов восстановления костной ткани, что наиболее актуально при поражениях костей, несущих осевую нагрузку (позвоночник, нижние конечности), обширных очагах деструкции. По данным ранее проведенных исследований и собственных клинических наблюдений, полноценное восстановление костной ткани в зоне оперативного вмешательства не достигается более чем в 40% при локализации вблизи эпиметафизарных отделов длинных трубчатых костей нижних конечностей [2], что приводит к развитию вторичных ортопедических последствий и осложнений. Установлено, что развитие данных осложнений при туберкулезном остите связано с наличием «остаточных полостей», заполненных рубцовой тканью, на фоне которых, в частности, продолжается рост костной ткани (у пациентов в возрасте до 20 лет) [30].

Исследования, связанные с развитием ортопедических последствий и осложнений на фоне остаточных рубцовых полостей при очаговых деструктивных поражениях иной этиологии, но аналогичной локализации в литературе не отражены. При этом установлено, что эпиметафизарные поражения характерны для пациентов, находящихся в периоде активного роста [24] вне зависимости от этиологии процесса.

С целью профилактики формирования рубцовых полостей применяется костная пластика материалами с заданными свойствами, среди которых предпочтение отдается биологическим аллогенным, биокомпозитным и/или небιологическим [44]. В зависимости от состава, пластический материал обладает остеокондуктивными, остеоиндуктивными и/или остеогенными свойствами, комбинация которых обеспечивает максимально полное восстановление кости без формирования остаточной полости. Однако, в условиях исходного хронического инфекционного процесса, используемый для пластики имплантат на фоне

закономерных биологических процессов адаптации может подвергаться ускоренному лизису и потере заданных свойств. При этом даже при нормально текущей адаптации большие костные дефекты требуют большего времени для восстановления и, следовательно, иммобилизации и ограничения осевой нагрузки на пораженный сегмент, что само по себе ухудшает условия реваскуляризации и остеогенеза, замедляя процессы остеорегенерации. Ранее проведенный анализ результатов лечения растущих пациентов с туберкулезными, в т.ч. БЦЖ оститами показал, что перестройка пластических материалов после операции происходит на протяжении 1 года, в связи с чем срок, превышающий этот период, используется как критерий понятия «Последствия» [16].

Таким образом, процессы остеорегенерации на протяжении первого года после операции следует рассматривать как формирующие либо реальное излечение без остаточных анатомических изменений, либо создающие условия для развития ортопедических последствий в будущем - что согласуется с общим для ортопедии принципом «управления ростом кости» в зонах и периодах ее наиболее эффективной перестройки [2; 118].

Среди методов регуляции восстановления костной ткани после деструктивного поражения и его оперативного лечения представляет интерес применение селективных ингибиторов остеокластов - бисфосфонатов [129]. Помимо лечения небактериального остеомиелита, также являющегося частной формой хронического остеомиелита, в т.ч. для снижения болевого синдрома, уменьшения размера и количества очагов [5; 66; 71; 80; 83; 91; 138], эти препараты широко применяют при литических костных опухолях, костных метастазах [124] и вторичном остеопорозе у взрослых [85; 117; 148], а у пациентов более раннего возраста их эффективность доказана при первичном остеопорозе [59], а в небольших группах - при фиброзной дисплазии, костных кистах, опухолях и скелетных метастазах, что обусловлено не только торможением остеокластов, но и противовоспалительным эффектом, связанным с ингибацией провоспалительных цитокинов [49; 63; 102; 125]. У растущих пациентов эффективность бисфосфонатов

при остеопорозе доказана на уровне двойных рандомизированных слепых контролируемых исследований [81]. В 2018 г. препараты памидроновой кислоты официально внесены в рекомендации по лечению НБО Американской коллегией ревматологов (ACR) в качестве третьего режима терапии (первые два — ингибиторы TNF-а и Метотрексат), а при вертебральной форме НБО — рекомендованы в качестве ведущей линии терапии [5; 82]. На сегодняшний день для пациентов с активным ростом костной ткани доказано отсутствие даже при многолетнем применении памидроната осложнений, характерных для взрослых — прежде всего, атипичных переломов; нежелательные явления ограничены только гриппоподобным состоянием (высокая температура, боли в мышцах в первый день введения), в связи с чем он водится только в стационарных условиях [80]. Именно хронические инфекционные поражения (оститы) остаются той патологией, в отношении которой эффективность БФ не вполне известна — возможно, ввиду ее крайней популяционной редкости. При этом положительные результаты применения алендроновой кислоты представлены отечественными авторами при диффузно-склеротическом, в т.ч. бактериологически подтвержденном остеомиелите нижней челюсти с рекомендациями использовать его в качестве рутинного метода лечения [19]. В единичных публикациях 2022 г., также указывается на иммуномодулирующий эффект БФ, улучшающий результаты лечения отдельных опухолей скелета [54], а также в эксперименте туберкулеза легких с множественной лекарственной устойчивостью при применении в составе комплексной терапии [150].

Применение бисфосфонатов может быть эффективным как для торможения первой фазы перестройки костной ткани и оптимизации адаптации имплантатов, применяемых при костной пластике, так и в качестве компонента патогенетической терапии при патологических процессах, протекающих с локальным остеопорозом - что характерно и для костного туберкулеза.

Степень разработанности темы

Вопросы применения бисфосфонатов при патологии скелета ограничиваются использованием при системном остеопорозе и деструктивных опухолях. Данные об их влиянии на оптимизацию остеорегенерации при оперативном лечении туберкулезного остита в литературе отсутствуют, за исключением единичных описаний [Quarta L. et al., 2008].

Цель работы

Экспериментальное обоснование применения бисфосфонатов для оптимизации процессов восстановления костной ткани при хирургическом лечении очаговых туберкулезных поражений скелета.

Задачи исследования

1. Оценить механизмы влияния бисфосфонатов на регенерацию костной ткани при оперативном лечении туберкулезного остита.
2. Изучить совместимость применения бисфосфонатов с противотуберкулезной терапией.
3. Сравнить особенности восстановления костной ткани при оперативном лечении экспериментального туберкулезного остита при проведении противотуберкулезной терапии, применении бисфосфонатов и их комбинации.
4. Изучить процессы адаптации имплантата на фоне применения бисфосфонатов.

Научная новизна исследования

Впервые в эксперименте на животных:

изучена эффективность применения бисфосфонатов (на примере препарата памидроновой кислоты) для оптимизации остеорегенерации при оперативном лечении туберкулезного остита;

оценен процесс послеоперационной адаптации костного пластического материала с остеоиндуктивными свойствами на фоне применения бисфосфонатов;

изучено послеоперационное течение туберкулезного остита на фоне применения бисфосфонатов при отсутствия специфической терапии;

обоснована возможность применения бисфосфонатов в комплексе с противотуберкулезными препаратами при туберкулезном остите.

Теоретическая и практическая значимость

Обосновано использование бисфосфонатов для регуляции процессов остеорегенерации при оперативном лечении экспериментального туберкулезного остита.

Установлено, что применение препарата памидроновой кислоты в послеоперационном периоде улучшает адаптацию имплантата путем торможения его резорбции и поддержания остеокондуктивных и остеоиндуктивных свойств.

Доказана совместимость применения бисфосфонатов на фоне специфической противотуберкулезной терапии.

Методология и методы исследования

По дизайну исследование является экспериментальным, проспективным и базируется на изучении результатов моделирования патологического процесса и его лечения у 21 лабораторного животного. При подготовке и реализации диссертационной работы использованы лабораторные (иммунологические, молекулярно-генетические, биохимические, морфологические, морфометрические), инструментальные (лучевые, хирургические), научные аналитические и статистические методы.

Исследование одобрено независимым этическим комитетом при федеральном государственном бюджетном учреждении «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России) (протокол №74 от 27.02.2021, выписка №74.1).

Положения, выносимые на защиту

1. Бисфосфонаты способствуют адаптации имплантата путем предотвращения его преждевременного лизиса и поддержания его остеокондуктивных и остеоиндуктивных свойств.

2. Бисфосфонаты безопасны при применении в послеоперационном периоде, не влияют на риск прогрессирования туберкулезного остита, совместимы с противотуберкулезной терапией.

3. Бисфосфонаты обеспечивают пролонгированную индукцию остеогенеза, что способствует восстановлению костной ткани при оперативном лечении туберкулезного остита.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность исследования определяется достаточным числом экспериментальных наблюдений, применением современных лабораторных и инструментальных методов, сертифицированного оборудования, адекватных методов статистического анализ

Результаты работы представлены на Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Фундаментальные исследования в педиатрии» (г. Санкт-Петербург, 2021); Конгрессе Российского общества рентгенологов и радиологов (г. Москва, 2021); Научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Студеникинские чтения - 2021» (г. Москва, 2021) и Научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Студеникинские чтения - 2022», (г. Москва, 2022) - получены дипломы III степени; X Конгрессе Национальной Ассоциации Фтизиатров с международным участием (г. Санкт-Петербург, 2021) и XI Конгрессе Национальной Ассоциации Фтизиатров с международным участием «Современные направления развития фтизиатрии: научные разработки, междисциплинарная интеграция, итоги и перспективы» (г. Санкт-Петербург, 2022); XIX съезде педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии» (г. Москва, 2022); World congress on osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases (virtual, 2022); 24th Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (virtual,

2022); IX Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения – 2022» (г. Санкт-Петербург, 2022); XII Всероссийском съезде травматологов-ортопедов (г. Москва, 2022).

Результаты исследования внедрены в образовательную деятельность ФГБУ ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России, используются в дополнительных профессиональных образовательных программах повышения квалификации по специальностям «Хирургия» и «Травматология и ортопедия», а также в учебном процессе кафедры патологической физиологии с курсом иммунопатологии ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России.

По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ, из них 3 в журналах из Перечня рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Российской Федерации для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Получено решение о выдаче патента (14.02.2023) "Способ стимулирования остеорегенерации после оперативного лечения туберкулезного остита в эксперименте" (заявка 2022134076 от 22.12.2022).

Личный вклад автора

Автором совместно с руководителями сформулирована концепция исследования, определены его дизайн, цели и задачи. Автором лично проведен поиск и анализ литературы, выполнены все этапы работы: ведение и обследование лабораторных животных, хирургические вмешательства, забор аутопсийного материала; проведены лабораторные и инструментальные исследования, выполнен набор и обработка данных, формирование баз данных, а также их интерпретация.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 149 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, двух глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, оценки перспектив дальнейшей разработки темы и списка использованной литературы, включающего 46 отечественных и 106 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 3 таблицами и 67 рисунками.

Глава 1. ОСТЕОДЕСТРУКЦИЯ И МЕТОДЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ДЕСТРУКТИВНОЙ ПАТОЛОГИИ: ИЗБРАННЫЕ ВОПРОСЫ (обзор литературы)

На сегодняшний момент, вопросы диагностики и лечения туберкулезных оститов, достаточно хорошо разработаны, в т.ч. благодаря исследованиям, протяжении более 50 лет проводившихся в мире и ФГБУ «СПб НИИФ» [6; 20; 43].

Тем не менее, ряд вопросов не только остаются не в полной мере решенными, но и вновь появляются в связи с новыми медицинскими данными. На трех из них решено остановиться в рамках настоящего обзора литературы, а именно: дифференциальная диагностика туберкулезного остита, методы регуляции восстановления костной ткани, применении БФ при локальном воспалительном деструктивном заболевании костной ткани.

1.1. ТУБЕРКУЛЕЗНЫЙ ОСТИТ В СТРУКТУРЕ ХРОНИЧЕСКИХ ОЧАГОВЫХ ДЕСТРУКТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СКЕЛЕТА

Деструктивные поражения скелета представляют собой гетерогенную группу заболеваний, объединенных сходной клинической и лучевой картиной. Под деструкцией костной ткани понимают нарушение структуры и целостности кости вследствие инфекционного [7], асептического воспалительного [75] или опухолевого процесса [52; 127; 151]. Очаги деструкции могут иметь различную локализацию, поражать губчатые и любые отделы трубчатых костей [48; 64]. Заболевания носят моноочаговый и/или мультиочаговый характер [23; 48; 60]; мультиочаговая форма инфекционных деструкций костей существенно отличается от поражений при системных онкогематологических и обменных заболеваниях [133]. Разные по этиологии костные деструкции сопровождаются различными клиническими, зачастую схожими неспецифическими проявлениями, среди которых наиболее постоянным симптомом является боль. На фоне наблюдения, лечения или из-за сопутствующей патологии локальная симптоматика может протекать прогрессирующе или волнообразно, а диагностическая пауза - составлять от нескольких дней до многих месяцев [33; 68].

Абсолютно необходимым для установления диагноза и определения показаний к хирургическому лечению, тактики до- и послеоперационного ведения является дифференциация между группами опухолевых и инфекционно-воспалительных процессов, а также определение конкретных вариантов поражений внутри групп.

Лишь немногие доброкачественные опухолевые заболевания и дистрофические процессы не требуют проведения инвазивных диагностических манипуляций ввиду из типичной клинико-лучевой картины и/или отсутствия показаний к хирургическому лечению. Так, считается, что диагноз «остеоид - остеома» может быть достоверно установлен на основании лучевых данных [62], а такие дистрофические заболевания, как болезнь Легг - Кальве - Пертеса, Кёнига могут успешно лечиться консервативно на ранних стадиях [18; 122]. Такие методы неинвазивной диагностики как остеосцинтиграфия, позитронно-эмиссионная томография, контрастные лучевые исследования позволяют заподозрить наличие у пациента процесс с высокой метаболической активностью, но не установить диагноз.

Единственным абсолютным методом верификации инфекционного поражения кости и, соответственно, назначения таргетной терапии, является бактериологическое, включая молекулярно-генетическое исследование материала из очага поражения [53; 103; 115]. Положения по обязательной локальной инвазивной диагностике включены в стандарты ВОЗ по туберкулезу [144], небактериального остеомиелита - в дифференциальные алгоритмы Jansonn [77], а также в диагностические правила по остеомиелиту и другие.

Бактериологическому и морфологическому исследованию может подвергаться материал из очага деструкции, часто получаемый посредством пункционной/трепан - биопсии, информативность которой может колебаться от 41 до 90% [147]. Отрицательный результат бактериологического исследования, вместе с тем, не является абсолютным доказательством асептической природы заболевания: с одной стороны, различия культуральных и молекулярно-

генетических методов верификации *M. Tuberculosis complex* могут достигать 40% [24], с другой, даже однократный курс эмпирической антибактериальной терапии может более, чем вдвое снижать вероятность идентификации возбудителя неспецифического остеомиелита [15]. Иммунологические и серологические методы диагностики туберкулеза неинформативны для внелегочных поражений и, согласно рекомендациям ВОЗ, не должны использоваться в качестве доказательства их этиологии [144; 145].

Верификация опухолевых поражений требует обязательного морфологического исследования материала из костного очага. При этом, помимо стандартных методик микроскопического исследования для определения типа и подтипа некоторых опухолей обязательным становится проведение дополнительных иммуногистохимических и молекулярно-генетических тестов, что внесено в последние классификационные документы ВОЗ [127].

Таким образом, ни один существующий метод диагностики не обеспечивает 100% информативности верификации этиологии деструктивного поражения, в связи с чем дифференциальная диагностика туберкулеза проводится со всеми вышеперечисленными заболеваниями. По сути, костный туберкулез является частной специфической формой воспалительных деструкций скелета.

Все *специфические процессы* имеют характерные морфологические признаки [37]. Развитие специфических процессов характеризуется последовательной сменой тканевых реакций с преобладанием продуктивной и формированием специфических гранул [119]. Возбудителями специфических гранулематозных оститов наиболее часто являются *Mycobacterium tuberculosis complex* (*M. tub. complex*), реже другие микобактерии, паразиты и грибы [104]. ***Нетуберкулезные*** специфические оститы встречаются достаточно редко [65; 99; 104]. При отсутствии прямого пути инфицирования (травма или хирургическое вмешательство) их развитие предполагает наличие у пациента первичного или вторичного иммунодефицита [99; 100]. В материале из очагов поражения наиболее часто выделяют нетуберкулезные микобактерии - *M. avium*, *M. kansasii*, *M.*

abscessus [56]; среди грибов - актиномицеты, аспергиллы, грибы рода *Candida* [50]; паразитов - *Echinococcus granulosus* [61].

Наибольшее число случаев **туберкулезных оститов** встречается на эндемичных территориях (Южная Америка, Южная Африка, Юго-Восточная Азия) [48]. В Российской Федерации в 2020 году при заболеваемости туберкулезом 32,4 на 100 тыс. взрослого население, 6,2 и 12,6 на 100 тыс. детского населения для возрастов от 0 до 14 и от 15 до 17 лет соответственно [13], на долю внелегочных поражений приходится менее 10% случаев с преобладанием поражений костной ткани. Диагностика остита осуществляется на основании бактериологического (культурального или молекулярно-генетического) исследования материала из костного очага. При этом имеет значение выделение конкретного штамма возбудителя с целью определения лекарственной чувствительности и подбора антибактериальной терапии. Установление диагноза “Туберкулез” при отсутствии обнаружения микобактерий возможно на основании характерных морфологических признаков, но в таком случае, согласно рекомендациям ВОЗ диагноз считается “установленным, но не доказанным” [146].

Очаговый деструктивный неспецифический процесс может являться исходом острого гематогенного остеомиелита, подострым или первично-хроническим [58]. Наиболее часто в изоляте из пораженной кости выделяют грам-положительные бактерии (*S. aureus*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp.), реже грам-отрицательные (например, *Enterobacteriaceae*), еще реже - анаэробные бактерии [64; 134]. Авторы сообщают об отсутствии роста микроорганизмов у 40 - 50% пациентов с гематогенным путем инфицирования [76; 96]. В последнее время, в связи, с одной стороны совершенствованием лабораторных методов диагностики, а с другой - более тщательным поиском этиологического фактора в неверифицированных случаях, в качестве этиологического агента все чаще упоминаются “редкие бактерии”, т.е. микроорганизмы редко вызывающие заболевания у человека, являющиеся частью нормальной микрофлоры [134]. Одним из таких микроорганизмов является *Kingella kingae* - основной возбудитель

гематогенного остеомиелита в Европе и США [143]. У пациентов с компрометированным иммунным статусом микробиологический профиль остеомиелитов представляется более разнообразным за счет выявления в очагах деструкции условно патогенных микроорганизмов (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Rhizopus* sp. и других) [100; 113]. Отдельной группой являются эндемичные для определенной территории (*Burkholderia pseudomallei* - для тропиков и субтропиков) или для профессиональной деятельности микроорганизмы (например, *Brucella melitensis* и др. для сельских хозяйств) [112].

Выделение возбудителя из очага деструкции является обязательным для подтверждения диагноза неспецифического остеомиелита, однако, как отмечено выше, его частота может не превышать 60%. Ранее считалось, что виной этому является предшествующая инвазивной диагностической манипуляции эмпирическая антибактериальная терапия, однако, в настоящее время указывается на отсутствие достоверной взаимосвязи этих признаков [96; 128].

Следующей нозологией, с которой проводится дифференциальная диагностика туберкулезных оститов, является **небактериальный остеомиелит** - гетерогенная группа хронических неинфекционных воспалительных поражений костной ткани, с единичными или множественными очагами, склонными к рецидиву [72; 106]. Заболевание, как правило, носит полигенный характер, однако описаны и моногенные синдромы, имеющие схожие клинические и морфологические проявления (синдром DIRA, синдром PAID и др.) [73]. НБО характеризуется стерильным посевом материала из патологических очагов, неспецифическими признаками воспалительного процесса при морфологическом исследовании (остеолизис, остеосклероз, воспалительная инфильтрация, преимущественно лимфоцитами, а также плазматическими клетками, гистиоцитами и единичными сегментоядерными лейкоцитами) [77]. Кроме того, выделяют характерные клинические и лучевые особенности поражения костной ткани, необходимые для установления диагноза. Эти особенности указаны в критериях А. Jansson и соавт., [74], которые постоянно дополняются в ходе

современных исследований. Наибольшую диагностическую ценность представляют оценка возраста пациента, локализации и числа патологических очагов [70; 151], наличие остеосклероза при рентгенологическом исследовании, выявление бессимптомных очагов по данным МРТ в режиме “total body” или остеосцинтиграфии [142]. Заболевание обычно дебютирует до 10 лет, чаще имеет более одного костного очага [95]. Поражение костей верхнего плечевого пояса, стопы, метафизарных отделов бедренной и большеберцовых костей специфично для НБО [23], отдельно описана вертебральная форма [5]. Таким образом, НБО является “диагнозом исключения”, устанавливаемым на основании обнаружения воспалительных изменений при гистологическом исследовании, отрицательных результатах бактериологического посева, а также соотношения клинико - лучевой картины с диагностическими критериями.

Таким образом, к синдрому «очаговой костной деструкции» относится большое количество гетерогенных состояний. Выявление «типичных» клинико-рентгенологических признаков в большинстве случаев не позволяет дифференцировать природу патологического процесса, а установление диагноза возможно только при использовании методов инвазивной диагностики. При этом результаты рутинных диагностических методов могут быть недостаточно информативными в плане верификации возбудителя инфекционного процесса. В настоящее время не существует неинвазивного варианта диагностики костного туберкулеза.

1.2. МЕТОДЫ РЕГУЛЯЦИИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ

Хирургическое лечение хронических инфекционных поражений костей заключается в проведении резекции и санации патологического очага в пределах здоровых тканей. Объем резекции определяется по данным лучевых (рентгенологических и КТ данных) на этапе предоперационного планирования, но может быть расширен во время хирургического вмешательства. Большой объем резекционной полости, нахождение последней в эпифизе длинных трубчатых костей, особенно – нижних конечностей, требуют проведения костной пластики с

целью ускорения процессов остеорегенерации и профилактики вторичных ортопедических осложнений [28].

Считается, что незамещенная костная полость является резервуаром скопления кровяных сгустков, которые представляют собой субстрат развития эндогенных инфекций, в том числе способствующих поддержанию текущего воспаления при специфических процессах [26]. Аутопластический материал обладает оптимальным сочетанием остеокондуктивных, остеоиндуктивных и остеогенных свойств при отсутствии иммуногенности [47], однако, забор аутокости увеличивает травматичность и длительность операции, может сопровождаться осложнениями со стороны донорской зоны, частота которых достигает 67% [21], прежде всего связанных с хроническим болевым синдромом.

Появление современных костно-пластических материалов позволяет почти полностью отказаться от костной аутопластики [12; 45]. Выбор пластического материала должен основываться на анализе его свойств и подбираться с учетом этиологии и локализации патологического процесса [17]. Наибольшее число современных публикаций, касающихся костной пластики, посвящено сравнению новых костно-пластических материалов с комбинированными свойствами с материалами, данных свойств не имеющими [25; 94]. Наибольший интерес при этом представляют остеогенные свойства, достигаемые за счет комбинации остеокондуктивного и/или остеоиндуктивного материала с костными морфогенными белками, мезенхимальными клетками или биоактивными молекулами [39; 44]. Применение подобных имплантатов представляет научный интерес, однако, не может быть рекомендовано как универсальное решение проблемы восстановления костной ткани ввиду высокой стоимости разработки и внедрения комбинированных имплантатов и, соответственно, ограниченного числа исследований по их применению. Кроме того, применение любых препаратов, обладающих остеогенными свойствами, противопоказано при подозрении на опухолевый процесс [38; 40].

Замещение обширных костных дефектов при неспецифических остеомиелитах также является предметом активного современного изучения [97; 126]. Рассматриваются вопросы создания индуцированных мембран - основы для восстановления кости при больших, в том числе, сегментарных дефектах [69; 101]. В то же время, наибольшее число публикаций, касающихся туберкулезных процессов, посвящено вертебральной патологии - восстановлению опорности позвоночника после хирургического лечения [105; 130; 131; 140; 141]. Вместе с тем, экспериментальное исследование эффективности костной пластики при туберкулезном остите длинных трубчатых костей у кроликов демонстрирует эффективность и безопасность различных имплантатов [28].

Таким образом, несмотря на то, что эффективность и безопасность костной пластики пострезекционного дефекта подтверждается данными современной литературы, выбор материала для нее должен осуществляться в зависимости от возраста пациента, этиологии процесса, объема дефекта и стоимости имплантата. При этом применение самых современных материалов не гарантирует отсутствия лизиса имплантата. При высокой активности остеокластов, а также при избыточной иммобилизации пораженного сегмента процессы регенерации кости могут быть нарушены даже в здоровой костной ткани. Именно лизис имплантата и возможное заполнение пострезекционной полости рубцом может привести к ортопедическим последствиям [2].

1.3. ПРИМЕНЕНИЕ БИСФОСФОНАТОВ (СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР)

К БФ относится группа препаратов на основе пирофосфата, ингибирующих костную резорбцию за счет угнетения активности остеокластов, а также влияния на дифференцировку их и их предшественников [129]. БФ проявляют химическое сродство к минералу основного аморфного вещества кости - гидроксиапатиту, поэтому могут продолжительное время сохраняться в местах активного костеобразования, что, по-видимому, обуславливает длительное сохранение эффекта после прекращения лечения [81]. Инструктивными показаниями к применению БФ являются литические опухоли и костные метастазы [86],

гиперкальциемия [51; 137], обусловленная злокачественными опухолями, постменопаузный остеопороз [84; 107], остеопороз у женщин и мужчин [139], в т.ч. на фоне применения глюкокортикостероидов [79], костная болезнь Педжета [98]. При этом возраст менее 18 лет является противопоказанием к применению БФ. Несмотря на это БФ широко применяются при других заболеваниях [116], а также у пациентов не достигших восемнадцатилетнего возраста, что представляет научно-исследовательский интерес и отражено в данном обзоре.

БФ являются практически единственным эффективным методом лечения несовершенного остеогенеза (НО) [89], а при некоторых его формах их введение рекомендуется с рождения по жизненным показаниям [123]. В 2018 г. препараты памидроновой кислоты официально включены Американской коллегией ревматологов (ACR) в рекомендации по лечению небактериального остеомиелита в качестве третьего режима терапии (первые два — ингибиторы TNF-а и Метотрексат), а при вертебральной форме небактериального остеомиелита рекомендованы в качестве ведущей линии терапии [82]. БФ также применяются при других заболеваниях и состояниях, связанных с локальным снижением минеральной плотности костной ткани (МПКТ): литических опухолевых и дистрофических поражениях - костных кистах, фиброзной дисплазии [49], гигантоклеточных опухолях [54], болезни Пертеса [63; 102; 122; 125], синдроме Горхема - Стаута [108] и др.

При лечении **несовершенного остеогенеза** бисфосфонаты успешно применяются более 30 лет [129], и включены в соответствующие международные рекомендации в 2000 году [110], а в отечественные - в 2014 [41]. При несовершенном остеогенезе бисфосфонаты являются наиболее эффективным методом лечения первичного остеопороза и обеспечивают:

1. увеличение МПКТ, что приводит к снижению частоты переломов длинных трубчатых костей и компрессионных переломов [149];
2. уменьшение болевого синдрома и повышение качества жизни пациентов [90; 123];

3. снижение темпа прогрессирования сколиоза [121] и увеличение высоты тел позвонков;

4. переход от интенсивной фазы лечения к поддерживающей без снижения эффективности терапии [132];

5. отмена препаратов после окончания костного роста в течение 2 - 4 лет не приводит к снижению МПКТ или увеличению числа переломов [111].

БФ, применяемые при терапии **небактериального остеомиелита**, обеспечивают:

1. значительное снижение болевого синдрома при периферических и вертебральных формах, в том числе после первого введения [136];

2. достижение ремиссии или частичной ремиссии.

При **остеопорозе** разной этиологии БФ эффективны для повышения МПКТ, снижения частоты возникновения переломов и улучшения качества жизни. В свою очередь, *побочные эффекты* в виде реакции острой фазы воспаления на первое введение препарата имеют до 100% пациентов, также отмечены гипокальциемия и боли в костях [55].

При вторичном остеопорозе на фоне **детского церебрального паралича (ДЦП)** применение БФ обеспечивает:

1. статистически значимое увеличение МПКТ в поясничном отделе позвоночника [88];

2. снижение частоты переломов длинных трубчатых костей и компрессионных переломов позвонков [57; 81];

3. при этом эффективность внутривенного введения памидроната (ПМ) и перорального применения алендроната (АЛ) сопоставима [88].

Интересны результаты, характеризующие применение БФ при:

спинальной мышечной атрофии применение БФ эффективно для лечения остеопороза, сопровождается снижением частоты переломов и увеличением МПКТ. В свою очередь, *побочные эффекты* характеризуются транзиторной гипокальциемией и гипофосфатемией;

ювенильном дерматомиозите применение АЛ приводит к прекращению прогрессирования или частичному регрессу периартикулярного и субфасциального кальциноза;

гигантоклеточных опухолях применение БФ после операции снижает риск рецидива опухоли.

Побочные эффекты БФ отличаются в различных возрастных группах. В публикациях, касающихся детей, не упоминается о таких встречающихся у взрослых осложнениях, как остеонекроз нижней челюсти или атипичный перелом бедра, а долгосрочное влияние БФ на опорно-двигательный аппарат детей ограничено формированием zebra-линий в метафизах длинных трубчатых костей [88]. К побочным эффектам, наиболее часто описанным у детей, относят реакцию острой фазы воспаления на первое введение препаратов, проявляющуюся повышением температуры, диспептические явления, а также гипокальциемию/гипофосфатемию [149]. При приеме препаратов перорально возможны транзиторные нарушения ЖКТ, не требующие отмены терапии [149]. Значительно реже встречаются боли в костях [152], анемия и повышение уровня С-РБ крови [114], головная боль [90], уменьшение МПКТ в дистальном отделе лучевой кости [111].

Противопоказаниями для применения бисфосфонатов являются заболевания, характеризующиеся костным склерозом и повышенной МПКТ, беременность, почечная недостаточность, активный рахит.

Применение БФ при инфекционных костных деструкциях в литературе не описано. Однако, имеются публикации, посвященные их использованию БФ при туберкулезном остите с целью регулирования остеорегенерации на фоне специфической терапии [78]. Имеющиеся публикации позволяют рекомендовать использование бисфосфонатов, помимо инструктивных показаний, при НО, НБО и ДЦП. Отсутствие большого количества клинических при данных заболеваниях можно объяснить, в том числе, их низкой частотой. Например, частота НО колеблется от 1/10000 до 1/20000 новорожденных [109], а предполагаемая

распространенность НБО составляет 1 - 2 случая на 1 млн., поражая, в основном, детей в возрастной группе от 2 до 17 лет [67]. Проведение слепых плацебо-контролируемых исследований в этих случаях затруднено ввиду этических аспектов несмотря на многократные указания на положительное влияние БФ на снижение частоты патологических переломов, очагов поражения и улучшение качества жизни пациентов. Обращает на себя внимание и то, что на фоне многолетнего опыта применения БФ полностью отсутствуют публикации, посвященные их тератогенному влиянию, хотя беременность указывается как противопоказание в соответствующих инструкциях. При этом отмечена длительная персистенция в организме с обнаружением следов БФ в моче в течение восьми лет после последнего введения [81].

Таким образом, применение БФ, при заболеваниях, не указанных в инструкции по применению препаратов:

- приводит к увеличению МПКТ;
- обеспечивает снижение частоты переломов длинных трубчатых костей и компрессионных переломов позвонков;
- приводит к улучшению качества жизни пациентов.

БФ являются препаратами выбора при лечении НО и входят в третью линию терапии НБО, при этом:

- наиболее изучены эффекты препаратов на основе памидроновой, золедроновой, аледроновой и неридроновой кислот;
- эффективность внутривенного введения памидроната и перорального применения алендроната сопоставима.

Наличие таких эффектов БФ, как угнетение остеокластов, повышение МПКТ и противовоспалительный эффект позволяет рассматривать их применение в качестве сопутствующей медикаментозной терапии и при хирургическом лечении очаговых деструктивных заболеваний скелета инфекционно-воспалительной этиологии.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное, контролируемое исследование выполнено на базе лаборатории экспериментального туберкулеза и инновационных технологий ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России.

Все исследования в рамках работы проведены в соответствии с:

- разделом IV «Санитарно - эпидемиологические требования к обеспечению безопасности при работе с ПБА» Постановления Государственного санитарного врача Российской Федерации №4 от 28 января 2021 года «Об утверждении санитарных правил и норм СанПин 3.3686 - 21 «Санитарно - эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» [34];

- ГОСТ 33215 - 2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» [8];

- ГОСТ 33216 - 2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» [9].

Все процедуры с животными в исследованиях рассмотрены и утверждены локальным этическим комитетом ФГБУ «Санкт - Петербургский научно - исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России на предмет соответствия этическим принципам обращения с лабораторными животными «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях. ETS N 123, 1991» [92] и ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» [8].

2.1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАТЕРИАЛА И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включены результаты наблюдения за 21 кроликом - самцом породы «Советская шиншилла» (поступление животных - из ФГУП «Питомник

лабораторных животных «Рапполово» ФГБУ «Национальный центр «Курчатовский институт»).

Лабораторные животные содержались в условиях сертифицированного вивария ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России. Кроликов размещали по одной особи в клетках из нержавеющей стали тип NYA K ($S = 4200 \text{ см}^2$), оборудованными кормушками и стандартными поилками.

Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды. Световой режим: 12 часов – свет, 12 часов – темнота. Температура поддерживалась в пределах $+23 - +25^\circ\text{C}$, относительная влажность – 50 - 70%. Воздухообмен поддерживался с помощью приточно-вытяжной вентиляции, стерилизация воздуха осуществлялась ежедневно путем кварцевания.

Пищевой рацион соответствовал приказу Минздрава СССР «Нормативы затрат кормов для лабораторных животных» №1179 от 10 октября 1983 г. [29]. Корм и вода (согласно СОП ОЖ - X - 3v1 и соответствующая СОП АБ - 38v2) давались *ad libitum*.

Модельные животные до начала исследования проходили карантин (акклиматизационный период) сроком 14 дней, во время которого у животных контролировали клиническое состояние путем визуального осмотра, регистрировали поведение и общее состояние, качество волосяного покрова, потребление ими кормов и воды. Еженедельно осуществляли мониторинг динамики массы тела животных, для взвешивания использовали электронные весы модели Adventurer™, точность взвешивания $\pm 0,1 \text{ г}$.

2.2 ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

Половозрелые кролики-самцы породы «Советская шиншилла» имели исходную массу тела $3456,2 \pm 321,6 \text{ г}$. Животных включали в исследование после двухнедельного карантина, при отсутствии внешних признаков патологии, изменений в общеповеденческих реакциях.

Критерий исключения экспериментального животного из исследования: летальный исход.

В процессе исследования, после моделирования очага специфического воспаления и проведения кожных проб, животные были разделены на группы в зависимости от предпринятого хирургического и варианта последующего медикаментозного лечения (Рисунок 1 Рисунок 1).

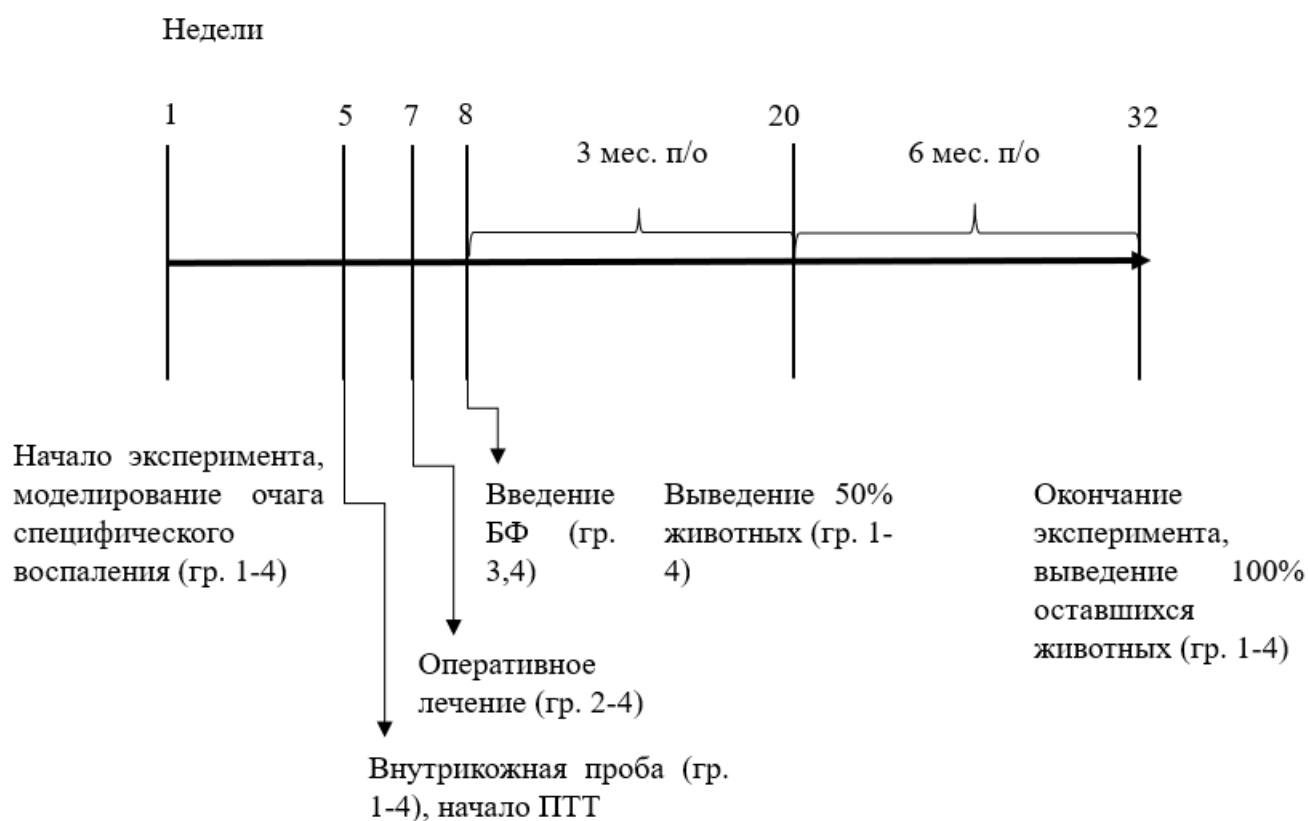


Рисунок 1 - Дизайн исследования

БФ – бисфосфонаты, ПТТ – противотуберкулезная терапия

Группы наблюдения:

группа 1 контроль заражения ($n = 3$) - кролики с моделированным туберкулезным оститом, которым не проводилась некрэктомия и пластика операционного дефекта, не получавшие противотуберкулезную терапию (ПТТ) после рандомизации;

группы 2 - 4 – модель туберкулезного остита, т.е. кролики, которым после развития специфического деструктивного очага, выполнялась некрэктомия полости деструкции, операционный дефект замещался гранулами имплантата Osteoset®2DBM Pellets, а далее ...:

- группа 2 (n = 4) - ПТТ продолжалась до завершения эксперимента в прежнем объеме (изониазид — 10 мг/кг, этамбутол и пиразинамид 20 мг/кг per os 1 раз в сутки 5 раз в неделю);
- группа 3 (n = 7) - через 10 дней после операции выполнено однократное введение БФ (памидроновая кислота 1 мг/кг внутривенно медленно) на фоне продолжающейся ПТТ;
- группа 4 (n = 7) - на 10 сутки после операции выполнено однократное введение БФ при отмене послеоперационного и дальнейшего проведения ПТТ.

Исследование включало 7 основных контрольных точек (Рисунок 2):

1. Определение исходных показателей массы тела кроликов и забор периферической крови для биохимического исследования. Создание модели костного туберкулеза (заражение) [36].

2. Контроль эффективности модели костного туберкулеза производился через 4 недели после заражения методом кожных проб с помощью Диаскинтест®. После получения положительных результатов проб всем кроликам назначалась противотуберкулезная терапия [46].

3. Определение массы тела и забор периферической крови для биохимического исследования на фоне течения туберкулезного остита через 6 недель после заражения. Оперативное лечение в объеме некрсеквестрэктомии, костной аллопластики [43] в группах 2 - 4 (операционный материал направлялся на ПЦР - исследование). ПТТ в группах 2 и 3 продолжалась далее до выведения животных, в группе 4 отменена.

4. Определение массы тела и забор периферической крови для биохимического исследования через 10 дней после оперативного лечения в группах

2 - 4, и в аналогичные сроки в группе 1. Введение памидроновой кислоты однократно внутривенно капельно в дозе 1 мг/кг.

5. Определение массы тела и забор периферической крови для биохимического исследования через 3 месяца после выполнения хирургического лечения. Выведение 50% животных. Забор аутопсийного материала: диафиз и дистальный эпиметафиз правой бедренной кости.

6. Определение массы тела и забор периферической крови для биохимического исследования через 6 месяцев после хирургического лечения. Выведение 100% животных. Забор аутопсийного материала: диафиз и дистальный эпиметафиз правой и левой бедренных костей.

7. Статистическая обработка результатов исследования.

Контрольные точки исследования	Календарное время, недели	Диагностические манипуляции	Хирургические манипуляции	Терапия	
Точка 1	6 недель	1-я	Взвешивание, забор крови (все группы)	Заражение (все группы)	
Точка 2		5-я	Внутрикожные пробы, забор крови, взвешивание (все группы)	ПТТ (все группы)	
Точка 3		7-я	Забор крови, взвешивание (все группы)	Оперативное лечение, забор материала для бак. исследования (Группы 2-4)	ПТТ (Группы 2-3)
Точка 4	3 месяца	8-я		БФ (Группы 3-4)	
Точка 5		20-я	Забор крови, взвешивание (все группы)	Выведение 50%, забор аутопсийного материала (все группы)	
Точка 6	6 месяцев	32-я	Забор крови, взвешивание (все группы)	Выведение 100%, забор аутопсийного материала (все группы)	
Точка 7			КТ исследование аутопсийного материала. Морфологическое исследование. Статистический анализ.		

Рисунок 2 - Схема исследования

БФ – бисфосфонаты, ПТТ – противотуберкулезная терапия

КТ – компьютерная томография

Критерии оценки эффективности:

1. Клиническая оценка состояния модельных животных:
 - оценка состояния животных (удовлетворительное/неудовлетворительное);
 - ежедневный контроль за потреблением воды и продуктов питания;
 - периодический (согласно Рисунок 2) мониторинг динамики массы тела животных с использованием электронных весов модели AdventureTM, точность взвешивания $\pm 0,1$ г.
 - физическая активность (хорошая/снижена);
 - заживление операционной раны (первичным натяжением/ вторичным натяжением);
 - осложнения со стороны операционной раны (абсцессы, гематомы – есть/нет); хромота (есть/нет).
2. Оценка эффективности модели туберкулезного остита - проба с Диаскинтестом[®], ПЦР - диагностика.
3. Оценка биохимических показателей периферической крови.
4. Микрокомпьютерная томография образцов костной ткани.
5. Морфологическая и морфометрическая оценка зоны хирургического вмешательства, интактной зоны и контралатерального сегмента бедренной кости.

2.3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.3.1 Протокол создания экспериментальной модели костного туберкулеза

Создание экспериментальной модели костного туберкулеза выполнялось согласно ранее разработанному методу моделирования туберкулезного остита [36] в медиальной мышечке правой бедренной кости в модификации (см. *III Интраоссальное введение инфекта*).

За час до операции проводилась антибиотикопрофилактика с применением цефазолина (10 мг/кг внутримышечно). Общую анестезию и седацию животных осуществляли путем внутримышечного введения препаратов «Золетил» (золозепам + тилетамин (Virbac S.A., France) в дозе 25 мг/кг массы тела) и «Ксила»

((Xylazinum, Interchemie Werken «deAdelaar» BV, Netherlands) в виде 2% раствора в объеме 1,0 - 1,5 мл).

Кролика укладывали в положении на спине на специальном станке. Конечности колика фиксировались на станке в положении максимального разгибания, правая нижняя конечность также в положении наружной ротации. После седации и фиксации животного выполнялось депиляция нижней трети бедра, области коленного сустава, верхней трети голени.

Основные этапы создания экспериментальной модели костного туберкулеза:

I Хирургический доступ. Обработка операционного поля раствором йода. Разрез по передне-медиальной поверхности нижней трети правого бедра длиной 5 см, впереди и параллельно боковой связке коленного сустава. Мягкие ткани рассекались у переднего края боковой связки до кости и отодвигались распатором вместе с надкостницей книзу и медиально.

II Формирование канала в бедренной кости. Заготовка аутотрансплантата. В медиальном мыщелке бедренной кости троакар 0,8 мм, ориентированным перпендикулярно оси конечности, выполнялось отверстие на глубину 0,5 - 0,8 см. Кровотечение из губчатой кости останавливалось тампонадой марлевой салфеткой. Полученный столбик костной ткани сохранялся в стерильных условиях в качестве аутотрансплантата.

III Интраоссальное введение инфекции. В качестве инфекционного агента использовали трехнедельный лекарственно - чувствительный стандартный штамм *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ТВС # 1/47, источник – Институт гигиены и эпидемиологии, Прага, 1976 г.), полученный из ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России. Микобактериальную суспензию готовили в день эксперимента, вносили в гемостатическую губку размером 2×2 мм (заражающая доза 1×10^6 микробных клеток/0,2 мл), которую устанавливали в троакар, заряженный аутокостным трансплантатом. Троакар вводили в сформированный костный канал. После чего гемостатическая губка с

трансплантатом выталкивалась мандреном до дна костного дефекта (модификация).

IV Пломбирование. Наружная поверхность установленного трансплантата и прилегающие к нему края восполненного костного дефекта изолируются от параоссальных мягких тканей цементной пломбой. Послойный шов раны.

Антибиотикопрофилактика в послеоперационном периоде продолжалась в течение 5 суток (Цефамезин 10 мг/кг 1 раз в сутки внутримышечно).

2.3.2 Протокол хирургического лечения

Методы анестезии, положения кролика и подготовки операционного поля аналогичны методам, изложенным в Протоколе создания экспериментальной модели костного туберкулеза.

Этапы операции:

I Хирургический доступ. Обработка операционного поля раствором йода. Разрез по передне-медиальной поверхности нижней трети правого бедра длиной 5 см по старому послеоперационному рубцу. Рассечение мягких тканей у переднего края боковой связки до кости и отодвигание их распатором вместе с надкостницей книзу и медиально. Иссечение патологических мягких тканей, абсцессов, свищей.

II Некрсеквестрэктомия. В медиальном мышечном кармане правой бедренной кости полукружным долотом 0,5 см выполнялось отверстие, через которое острыми костными ложками удалялись патологические ткани. После удаления всех нежизнеспособных тканей стенки образовавшейся полости обрабатывались раствором перекиси водорода и костными ложками до здоровой кости. Кровотечение из губчатой кости останавливалось тампонадой турундами с перекисью водорода.

III Костная пластика. Пострезекционная полость заполнялась гранулами аллотрансплантата Osteoset® 2DBM Pellets, Wright Medical Technology, Inc., USA. Количество гранул зависело от размера костной полости и составляло от 1 до 3. Достигалось плотное заполнение полости аллотрансплантатом. Гемостаз марлевыми салфетками. Послойное ушивание раны наглухо. Выбор пластического

материала осуществлен ввиду его высоких остеоиндуктивных свойств и стандартизированной формы выпуска. Основой материала является сульфат Са, сам по себе не обладающий свойствами остеоиндукции, но содержащий костные морфогенные белки и факторы роста BMP-2, BMP-4, IGF-1 и TGF- β 1. Его эффективность ранее доказана при костно-суставном туберкулезе и при тяжелых посттравматических остеомиелитах [16].

Патологические ткани из очага поражения помещались в стерильные контейнеры и доставлялись в лабораторию в течение 2х часов после забора материала для проведения ПЦР в режиме реального времени.

Послеоперационная антибактериальная профилактика в аналогичном Протоколу создания экспериментальной модели костного туберкулеза режиме.

2.3.3 Постановка внутрикожной пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным

С целью контроля активности туберкулезной инфекции у зараженных модельных животных осуществляли постановку внутрикожной пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным - АТР (Диаскинтест®). Препарат является рекомбинантным белком, продуцируемым генетически модифицированной культурой бактерии *Escherichia coli* BL21(DE3)/pCFP - ESAT, и содержит два антигена – CFP10 и ESAT6, связанные между собой. Указанные антигены присутствуют в вирулентных штаммах туберкулезных микобактерий, включая *M. tuberculosis* и *M. bovis*, и отсутствуют в штаммах БЦЖ *M. bovis*, из которых готовятся отечественные и зарубежные туберкулезные вакцины. Суть метода заключается в выявлении клеточного иммунного ответа на специфические антигены *M. tuberculosis*.

Исследование проводили через 4 недели после заражения. АТР вводили экспериментальным животным внутрикожно на спине справа на середине линии, соединяющей бугор подвздошной кости с последним ребром в концентрации 2 мкг/мл в 0,1 мл физиологического раствора. В ответ на внутрикожное введение АТР положительный результат пробы в виде развития гиперемии с инфильтратом

свидетельствовал о наличии сенсibilизации и подтверждал развитие туберкулезного процесса. Результаты внутрикожной пробы учитывали через 72 часа после постановки, при измерении поперечного размера гиперемии в миллиметрах в области введения препарата.

2.3.4 Протокол проведения противотуберкулёзной терапии

Противотуберкулезную терапию начинали после проведения внутрикожной пробы с АТР (Диаскинтест®) через 4 недели от момента заражения с использованием изониазида (ОАО «Мосхимфармпрепараты им. Н.А. Семашко» Россия, 10 мг/кг), этамбутола (Shreya Life Sciences, India, 20 мг/кг) и пиразинамида (АО «Фармсинтез», Россия, 20 мг/кг). Растворы препаратов вводили животным перорально 5 раз в неделю. Кролики 2 и 3 групп получали специфическую антибактериальную терапию весь период наблюдения.

2.3.5 Протокол введения бисфосфонатов

Через 10 дней после оперативного лечения и полного заживления операционной раны выполнялось внутривенное капельное введение препарата памидроновой кислоты «Памидронат Медак» (Impfstoffwerk Dessau - Tornau, GmbH, Germany) в дозировке 1 мг/кг разведенного в 20 мл раствора физиологического раствора 0,9%. Инфузия проводилась с помощью инфузомата и в течение 10 мин. Венозный доступ осуществлялся при помощи установки периферического катетера в ушную вену (Рисунок 3). Манипуляция проводилась без анестезиологического пособия или седации, выполнялась мягкая фиксация животных (Рисунок 3).

Выбор препарата памидроновой кислоты осуществлен с учетом того, что данный препарат имеет инъекционный путь введения (исключен фактор неадекватного всасывания в желудочно-кишечном тракте), а режим дозирования зависит от веса, что актуально для условий эксперимента.



Рисунок 3 - Фиксация животных (А), венозный доступ (Б)

2.3.6 Период наблюдения, эвтаназия и исследуемые данные (лабораторные, лучевые, морфологические)

Наблюдение за лабораторными животными осуществлялось в течение 3 и 6 месяцев после хирургического лечения.

Забор крови осуществляли из краевой ушной вены: в дебюте исследования, через 6 недель после заражения и в послеоперационном периоде (через 10 дней, 3 и 6 месяцев).

В сыворотке крови методом определяли наиболее часто используемые в клинической практике маркеры остеорегенерации, а именно - остеосинтеза: концентрацию общей щелочной фосфатазы (фермента, вырабатываемого остеобластами); альбумина; остеокальцина (неколагенового белка костной ткани, вырабатываемого остеобластами при участии витамина К и частично высвобождаемого в кровотоки, характеризующего минерализацию синтезированного коллагена I типа); - остеолизиса: β -Crosslaps (терминального белкового фрагмента, образовавшегося в результате деградации коллагена I типа); RANKL (мембранного белка, являющегося ключевым фактором дифференцировки и активации остеокластов); а также склеростина (секретируемого остеоцитами гликопротеина, ингибирующего образование костной ткани). Использовались стандартные наборы для биохимического анализатора (ООО «Эйлитон», Россия) и наборы для иммуноферментного анализа (ИФА) Rabbit Osteocalcin, Rabbit beta-

CTx, Rabbit receptor activator of nuclear factor kappa B ligand - ELISA Kit, China, Rabbit Sclerostin - MyBioSource, Canada соответственно.

Кролики выводились из эксперимента согласно принципам, изложенным в Рекомендациях Европейской комиссии по эвтаназии, указанным в ГОСТ 33215 – 2014 [8] с использованием введения в краевую ушную вену раствора Лидокаина 10% в дозе, в 5 раз превышающую максимальную допустимую.

После эвтаназии всем животным производили забор правой бедренной кости для проведения аутопсии; кроликам, выведенным из эксперимента через 6 месяцев - также забор левой бедренной кости.

Выполнялась макроскопическая оценка препарата – визуализация зоны операции, периферических костных разрастаний, формы и макроструктуры препарата.

Извлеченные образцы костей фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина (pH 7,4).

Лучевые исследования проводились с использованием микротомографа Skyscan 1172 (Bruker microCT, Belgium) совместно с сотрудниками ФГБУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет». Исследования выполнялись при размере пикселя 13 и 27 мкм, фильтр 0,5 мм Al, U=100 кВ, I=100 мкА, угол вращения 0,4 градуса, съемка 180 градусов, усреднение по 4 кадрам. При сканировании образец находился в полиэтиленовой пробирке с формалином и фиксировался фильтровальной бумагой. Реконструкция проводилась при помощи программы NRecon (Micro Photonics Inc., Poland), обработка реконструированных изображений - в программе CTAn (CTAN Team, Germany), RadiAnt DICOM Viewer (Medixant, Poland).

Выполнялась количественная и качественная оценка зоны имплантации, контралатерального мышечка правой бедренной кости, а также медиального мышечка левой бедренной кости по следующим параметрам:

– оптическую плотность оценивали в единицах Хаунсфилда в программе - просмотрщике медицинских лучевых данных RadiAnt DICOM Viewer на площади 0,001 см²;

– в соответствии с разработанной оригинальной условной качественно-количественной шкалой в баллах от 0 до 2, где 0 – признак отсутствует, 1 – умеренно выражен, 2 – ярко выражен оценены пять признаков, характеризующих остеорегенерацию - сохранение визуализации и прорастание имплантата костными балками, восстановление структуры кортикальной замыкательной и эпифизарной пластинок, структурность костных балок (максимально возможная сумма баллов – 10), а также 2 признака остеолизиса – наличие костных полостей и микросеквестров (максимальная сумма баллов – 4).

Стандартное гистологическое исследование микропрепаратов и морфологический анализ воспалительных и регенераторных процессов в тканях в ответ на проведенное хирургическое лечение с использованием дополнительных химиотерапевтических методов воздействия выполняли согласно ГОСТ ISO 10993 - 6 – 2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации» [10], после проведения микроКТ-исследования на базе ООО «Межрегиональный лабораторный центр» (г. Санкт-Петербург) на сертифицированном оборудовании при консультировании врача-морфолога Н.М. Блюм.

Изготовление микропрепаратов выполнялось по стандартной методике:

1. Предварительная декальцинация образцов в растворе TBD - 2 (Thermo, USA) в течении 10 - 21 дня. Готовность образцов определялась методом пробы тонкой иглой и разрезания. На моменте возможности выполнения срезов кость разрезалась на пластинки толщиной не более 0,4 мм и помещалась в гистологические кассеты для дальнейшей декальцинации до полного размягчения - в среднем около 4-х дней.

2. По мере готовности материал промывался водой и подвергался дальнейшим этапам гистологической проводки:

2.1 Обезвоживание и пропитывание парафином (по стандартизированной методике в автоматическом гистологическом процессоре Excelsior AS (Thermo, USA) в готовом растворе IsoPREP (Биовитрум, Россия) и парафиновой среде HISTOMIX (Биовитрум, Россия));

2.2 Изготовление срезов толщиной 3 - 5 мкм (с использованием ротационного микротомы HM 325 (Thermo, USA));

2.3 Депарафинирование, дегидратирование и окрашивание срезов по общепринятой стандартизированной методике гематоксилином и эозином в соответствии с рекомендациями производителя (Биовитрум, Россия) и по методу Циля - Нельсена для выявления КУМ.

Морфометрическое исследование выполнялось по сканированным на сканере Pannoramic (ZEISS Group, Germany) изображениям препаратов с использованием программ анализа изображений Orbit Image Analysis (Open Microscopy Environment Revision) и Pannoramic Viewer (3DHISTECH Ltd., Hungary) (Рисунок 4).

Описательным методом оценивались:

- распространенность, степень/ выраженность/ стадия специфического инфильтрата (в баллах от 0 до 5);
- наличие КУМ (в баллах от 0 до 3);
- формирование очагов распада, явлений организации, фиброза, наличие перифокального воспаления (есть, нет);
- толщина фиброзной капсулы (в баллах от 0 до 3);
- дистрофические и регенераторные изменения костной ткани (есть, нет);
- структурность формирования костных балок в зоне образованной костной мозоли (есть, нет).

Морфометрическим методом в 10 полях зрения при увеличении x1000 выполнялась оценка:

– количества и распределения клеток, характеризующих остеорегенерацию и ремодуляцию (osteoblastы, osteoclastы, osteocytes) – количество клеток;

– зрелость костной ткани в очаге поражения (активность osteoblastов и osteocytes, зрелость грануляционной ткани, фиброз, мезенхима, вновь образованные балочные структуры, секвестры) - в баллах от 0 до 3.

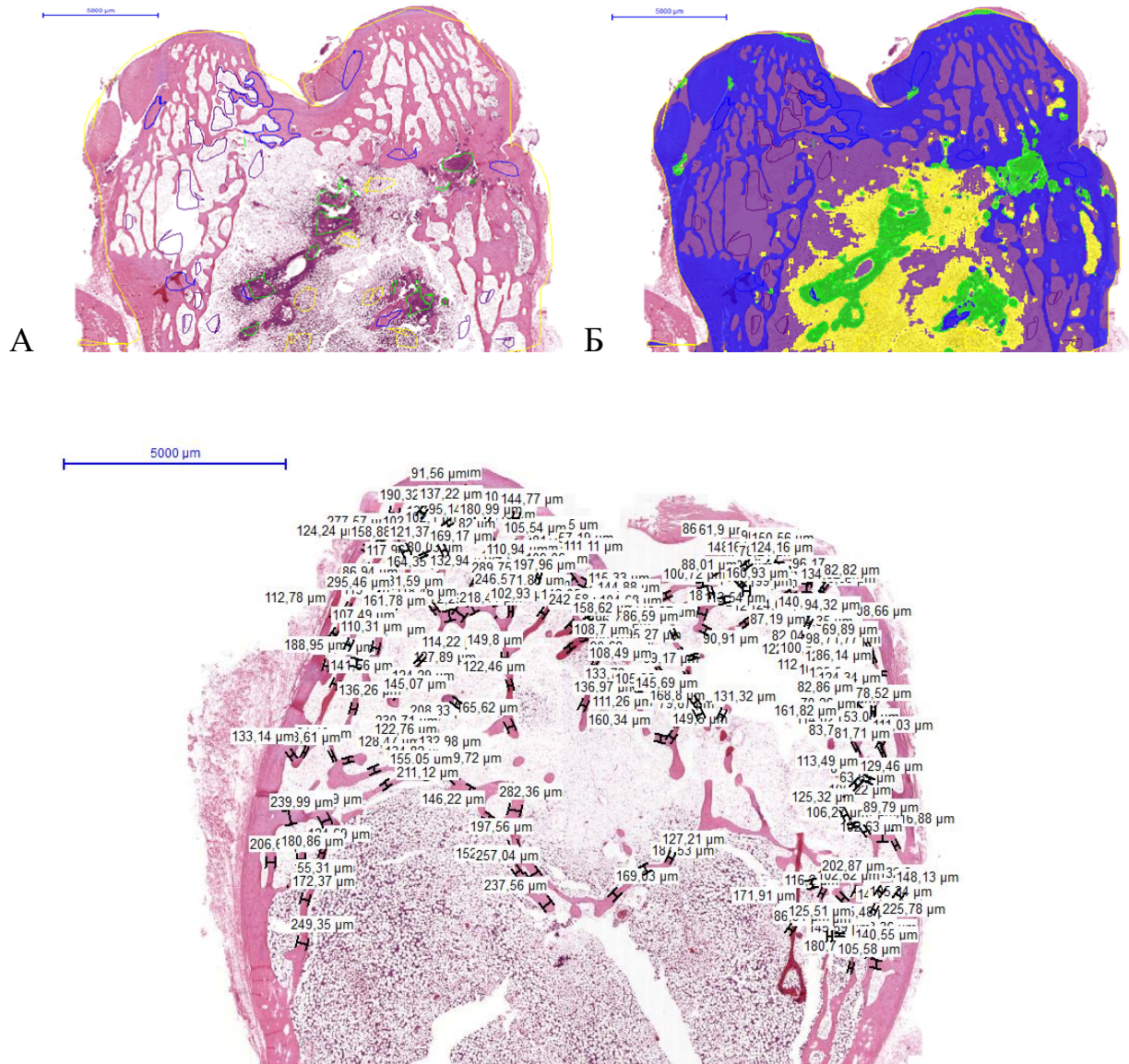


Рисунок 4 - Пример дифференцированного подсчета площадей разных тканей в программе морфометрического анализа изображений Orbit Image Analysis (А, Б) и толщины костных балок в программе Pannoramic Viewer (В) на сканированном изображении гистологического препарата дистального эпифиза бедренной кости кролика.

Морфометрический анализ в программе Orbit Image Analysis и Pannoramic Viewer оценивал:

- параметры площадей костной ткани (% от площади кости);
- параметры площадей специфического воспаления с разделением на зоны некроза, инфильтрата и фиброза (% от площади кости и % от площади всего воспаления);
- толщину костных балок (мкм) в эпифизарной части дистальных участков бедренных костей.

Описательным методом оценивались:

- распространенность, степень/ выраженность/ стадия специфического инфильтрата (в баллах от 0 до 5);
- наличие КУМ (в баллах от 0 до 3);
- формирование очагов распада, явлений организации, фиброза, наличие перифокального воспаления (есть, нет);
- толщина фиброзной капсулы (в баллах от 0 до 3);
- дистрофические и регенераторные изменения костной ткани (есть, нет);
- структурность формирования костных балок в зоне образованной костной мозоли (есть, нет).

Морфометрическим методом в 10 полях зрения при увеличении $\times 1000$ выполнялась оценка:

- количества и распределения клеток, характеризующих остеорегенерацию и ремодуляцию (остеобласты, остеокласты, остециты) – количество клеток;
- зрелость костной ткани в очаге поражения (активность остеобластов и остеоцитов, зрелость грануляционной ткани, фиброз, мезенхима, вновь образованные балочные структуры, секвестры) - в баллах от 0 до 3.

Морфометрический анализ в программе Orbit Image Analysis и Pannoramic Viewer оценивал:

- параметры площадей костной ткани (% от площади кости);
- параметры площадей специфического воспаления с разделением на зоны некроза, инфильтрата и фиброза (% от площади кости и % от площади всего воспаления);
- толщину костных балок (мкм) в эпифизарной части дистальных участков бедренных костей.

Особенности обработки данных:

1. Доля активных остеобластов рассчитывалась как отношение активных остеобластов ко всем клеткам эндоста, доля активных остеоцитов - как отношение активных остеоцитов к общему количеству остеоцитов в поле зрения.

2. Оценка активности туберкулезного воспаления выполнялась в баллах, где 0 – воспаление отсутствует; 1 — затихшие воспалительные изменения; 2 — ограниченные активные воспалительные изменения; 3 — распространенные активные воспалительные изменения без прогрессирования; 4 — распространенные активные воспалительные изменения с начинающимся прогрессированием; 5 — наиболее острые прогрессирующие изменения [22].

3. Оценка гистологических паттернов регенеративного остеогенеза (мезенхима, незрелая и зрелая грануляционная ткань), а также таких признаков, как полнокровие, отек и секвестры, проводилась в баллах по степени выраженности, где 0 – не выявлен, 1 – слабо выражен, 2 – умеренно выражен, 3 – ярко выражен.

4. При первичной статистической обработке данных среднее (M) и медиана (Me) рассчитывались для 10 полей зрения (эффективно для определения параметра общего числа клеток на участке).

5. Статистический анализ проводился также по всем полям зрения в группе (ввиду малой выборки).

2.3.7 Статистический анализ

Исследуемые данные подвергались статистической обработке при помощи программ Microsoft Exel (Microsoft, USA) и STATISTICA 12 (Dell, Inc., USA), характер распределения определялся с использованием критерия Шапиро - Уилка,

применялись методы описательной статистики и непараметрические методы (критерии Краскела - Уоллиса, Манна - Уитни) с определением показателей среднего значения (M), медианы (Me), доверительного интервала (p), различия считали достоверными при $p \leq 0,05$. Корреляционный анализ выполнен с помощью коэффициента корреляции Пирсона.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 КЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ МОДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

В период наблюдения между точками 1 - 5 у всех животных определялось удовлетворительное состояние, хорошая физическая активность, удовлетворительное потребление воды и питания. Масса тела животных представлена в Таблица 1.

. В период наблюдения между точками 5 - 6 у кролика №20 (группа 1) отмечается неудовлетворительное состояние, обусловленное снижением физической активности, хромотой, подкожным абсцессом в области правого коленного сустава, контрактурой сустава, потребление воды и питания при этом сохранено. Остальные животные в данный период наблюдения сохраняют показатели предыдущего периода.

Заживление операционной раны у всех животных первичным натяжением, хромота отсутствовала (исключая кролика №20, см. выше). В раннем послеоперационном периоде (3 - 7 сутки) у кролика №5 (группа 3) определялся подкожный абсцесс, дренировавшийся между швами и разрешившийся на фоне местного лечения (обработка р-ом кожного антисептика «Хлоргексидин», перевязки с раствором натрия хлорида 10%, 1 раз в сутки, 7 дней).

Таблица 1 - Масса тела и биохимические показатели кроликов

Показатель	Все животные	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Точка 1 (исходно)					
Масса, гр. Mean±SD	3456,2±321,6	3 446,7±272,9	3 008,5±274,8	3 572,0±248,3	3 600,3±216,9
Me (25%; 75%)	3518 (3356; 3626)	3546 (3138; 3656)	2983 (2802; 3215)	3618 (3390; 3736)	3526 (3490; 3626)
ОЩФ, Е/л Mean±SD	95,9±30,7	89,3±24,0	78,0±45,8	100,4±25,7	104,4±30,1
Me (25%; 75%)	94,0 (72,0; 120,0)	99 (62; 107)	64 (45; 111)	94 (91; 109)	120 (72; 134)
Остеокальцин Mean±SD	0,1±0,0			0,1±0,0	0,2±0,0
Me (25%; 75%)	0,1 (0,1; 0,2)			0,1 (0,1; 0,1)	0,2 (0,1; 0,2)
RANKL Mean±SD	61,5±16,2	81,6±0,0	48,7±0,0	53,7±11,6	67,4±18,3
Me (25%; 75%)	61,9 (48,7; 66,6)	81,6 (81,6; 81,6)	48,7 (48,7; 48,7)	52,5 (43,9; 63,5)	64 (56,2; 78,6)
Альбумин Mean±SD	47,6±3,3	49,0±4,6	47,7±4,9	47,4±3,5	47,0±2,3
Me (25%; 75%)	47 (45; 50)	50 (44; 53)	50 (42; 51)	46 (45; 51)	47 (45; 50)
Склеростин Mean±SD	105,2±79,8	162,0±0,0	71,5±67,2	104,0±147,1	118,0±0,0
Me (25%; 75%)	118,5 (24; 162)	162 (162; 162)	71,5 (24; 119)	104 (0; 208)	118 (118; 118)
β - Crosslaps Mean±SD	0,3±0,0				0,3±0,0
Me (25%; 75%)	0,3 (0,3; 0,3)	0 (0; 0)		0 (0; 0)	0,3 (0,3; 0,3)

Показатель	Все животные	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Точка 2 (1 месяц после заражения)					
Масса, гр. Mean±SD Me (25%; 75%)	3 608,8±325,1 3554 (3350; 3756)	3 481,3±185,5 3466 (3304; 3674)	3 212,0±113,3 3224 (3119; 3305)	3 779,4±315,9 3756 (3468; 3924)	3 719,4±270,9 3606 (3520; 3994)
ОЩФ, Е/л Mean±SD Me (25%; 75%)	65,4±25,5 66 (46; 79)	58,7±18,2 53 (44; 79)	56,3±27,7 65 (37; 75,5)	60,7±22,3 66 (45; 76)	78,1±29,7 81 (46; 94)
Остеокальцин Mean±SD Me (25%; 75%)	0,2±0,0 0,2 (0,1; 0,2)	0,2±0,0 0,2 (0,2; 0,2)	0,2±0,0 0,2 (0,1; 0,2)	0,1±0,0 0,2 (0,1; 0,2)	0,2±0,0 0,2 (0,1; 0,2)
RANKL Mean±SD Me (25%; 75%)	58,2±14,1 60,2 (49,6; 64,7)	52,9±9,6 56 (42,1; 60,6)	67,9±20,9 63,8 (55; 80,8)	60,9±10,4 62,5 (49,6; 68,9)	52,2±13,4 53,2 (42,2; 62,1)
Альбумин Mean±SD Me (25%; 75%)	45,1±2,8 45 (43; 48)	47,3±1,2 48 (46; 48)	43,0±3,7 42,5 (40,5; 45,5)	46,3±2,8 47 (44; 48)	44,1±1,5 44 (43; 45)
Склеростин Mean±SD Me (25%; 75%)	178,2±102,2 141,4 (115; 247,9)	155,1±82,4 127,3 (90,2; 247,9)	159,7±39,3 165,2 (118; 196)	231,0±130,8 191,9 (119,6; 353,3)	146,1±99,9 133,4 (99,5; 227,2)
β - Crosslaps Mean±SD Me (25%; 75%)	0,4±0,0 0,4 (0,4; 0,4)	0 (0; 0)		0 (0; 0)	0,4±0,0 0,4 (0,4; 0,4)

Показатель	Все животные	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Точка 3 (перед операцией)					
Масса, гр. Mean±SD	3 659,9±377,6	3 821,3±356,1	3 153,0±201,7	3 872,9±309,9	3 667,4±281,5
Me (25%; 75%)	3580 (3426; 4018)	3682 (3556; 4226)	3143 (2996; 3310)	3914 (3602; 4022)	3514 (3490; 4058)
ОЩФ, Е/л Mean±SD	55,9±18,5	50,0±24,1	40,5±20,9	52,1±13,2	71,0±10,0
Me (25%; 75%)	57 (47; 75)	48 (27; 75)	40 (23; 58)	50 (44; 60)	76 (58; 80)
Остеокальцин Mean±SD	0,1±0,0	0,1±0,0	0,2±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0
Me (25%; 75%)	0,1 (0,1; 0,2)	0,1 (0,1; 0,1)	0,1 (0,1; 0,2)	0,1 (0,1; 0,2)	0,1 (0,1; 0,2)
RANKL Mean±SD	62,9±11,5	66,3±18,1	68,6±5,1	63,3±7,0	57,9±14,5
Me (25%; 75%)	65,7 (54,4; 69,8)	60,2 (51,9; 86,7)	69,7 (65,1; 72,1)	66,4 (54,4; 68,6)	57,7 (48,5; 71)
Альбумин Mean±SD	44,7±2,9	43,7±3,2	47,0±1,0	45,8±3,2	43,3±2,4
Me (25%; 75%)	45 (42; 47)	45 (40; 46)	47 (46; 48)	46,5 (42; 49)	43 (41; 45)
Склеростин Mean±SD	204,0±104,2	229,6±107,9	145,1±56,2	244,7±149,0	185,8±59,9
Me (25%; 75%)	165 (155,6; 231,3)	177,6 (157,6; 353,7)	137,8 (103,3; 186,9)	181,7 (133,5; 370,2)	164 (158,5; 231,3)
Точка 4 (через 3 месяца после операции, 4,5 месяца после заражения)					
Масса, гр. Mean±SD	3 952,9±515,7	3 786,7±767,7	3 340,0±307,6	4 282,9±320,4	4 044,3±372,7
Me (25%; 75%)	3870 (3680; 4390)	3410 (3280; 4670)	3270 (3135; 3545)	4340 (4150; 4440)	3870 (3770; 4390)

Показатель	Все животные	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
ОЩФ, Е/л Mean±SD Me (25%; 75%)	38,3±12,6 37 (28; 50)	41,3±14,0 40 (28; 56)	28,0±9,7 25 (22; 34)	40,7±14,5 39 (28; 52)	40,6±10,9 37 (30; 51)
Остеокальцин Mean±SD Me (25%; 75%)	0,1±0,0 0,1 (0,1; 0,2)	0,1±0,0 0,1 (0,1; 0,1)	0,1±0,0 0,2 (0,1; 0,2)	0,1±0,0 0,1 (0,1; 0,2)	0,1±0,0 0,1 (0,1; 0,2)
RANKL Mean±SD Me (25%; 75%)	55,6±13,6 56,3 (47,4; 63,5)	52,7±21,4 48,1 (33,9; 75,9)	54,8±18,6 50,7 (42,4; 67,2)	58,2±10,7 60,9 (57,3; 63,5)	54,8±12,8 56,1 (45; 70,5)
Альбумин Mean±SD Me (25%; 75%)	44,1±3,6 44 (42; 46)	42,3±6,7 39 (38; 50)	42,8±3,3 42,5 (40,5; 45)	44,3±2,4 43 (42; 47)	45,4±3,6 44 (44; 46)
β - Crosslaps Mean±SD Me (25%; 75%)	3,0±0,0 3 (3; 3)	0 (0; 0)		0 (0; 0)	3,0±0,0 3 (3; 3)
Точка 5 (через 6 месяцев после операции, 4,5 месяца после заражения)					
Масса, гр. Mean±SD Me (25%; 75%)	4 033,1±637,9 4230 (3670; 4420)	3 720,0±989,9 3720 (3020; 4420)	3 400,0±381,8 3400 (3130; 3670)	4 498,0±289,4 4330 (4310; 4760)	3 925,0±657,5 3885 (3470; 4380)
ОЩФ, Е/л Mean±SD Me (25%; 75%)	23,7±16,8 15 (13; 35)	13,0±0,0 13 (13; 13)	22,5±13,4 22,5 (13; 32)	19,3±12,2 18 (10,5; 28)	31,5±24,2 25,5 (12,5; 50,5)
Остеокальцин Mean±SD Me (25%; 75%)	0,2±0,1 0,1 (0,1; 0,2)	0,1±0,0 0,1 (0,1; 0,1)	0,1±0,0 0,1 (0,1; 0,2)	0,2±0,2 0,1 (0,1; 0,3)	0,1±0,0 0,1 (0,1; 0,2)

Показатель	Все животные	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
RANKL Mean±SD	64,6±12,0	71,0±0,0	55,4±13,1	67,7±14,7	64,3±11,1
Me (25%; 75%)	64,7 (52; 71)	71 (71; 71)	55,4 (46,2; 64,7)	66 (57,2; 78,3)	64,6 (55,8; 72,9)
Альбумин Mean±SD	42,8±2,3	41,0±0,0	45,0±0,0	42,0±1,6	43,5±3,0
Me (25%; 75%)	42 (42; 44)	41 (41; 41)	45 (45; 45)	42 (41; 43)	42 (42; 45)
Склеростин Mean±SD	216,8±116,6	293,6±0,0	175,5±127,1	272,4±137,8	162,6±99,0
Me (25%; 75%)	186,6 (125,7; 305,9)	293,6 (293,6; 293,6)	175,5 (85,6; 265,4)	272,3 (156,9; 388)	132,9 (102,3; 223)
β - Crosslaps Mean±SD	1,0±0,0				1,0±0,0
Me (25%; 75%)	1 (1; 1)	0 (0; 0)		0 (0; 0)	1 (1; 1)

ОЩФ – общая щелочная фосфатаза

SD - среднеквадратическое отклонение

3.2 ОЦЕНКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ КОСТНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА

3.2.1. Оценка клеточного иммунного ответа на антигены *M. tuberculosis*

В ответ на внутрикожное введение АТР у всех животных зарегистрирован положительный результат, что свидетельствует о наличии сенсibilизации и подтверждает развитие туберкулезного процесса (Рисунок 5, Таблица 2).

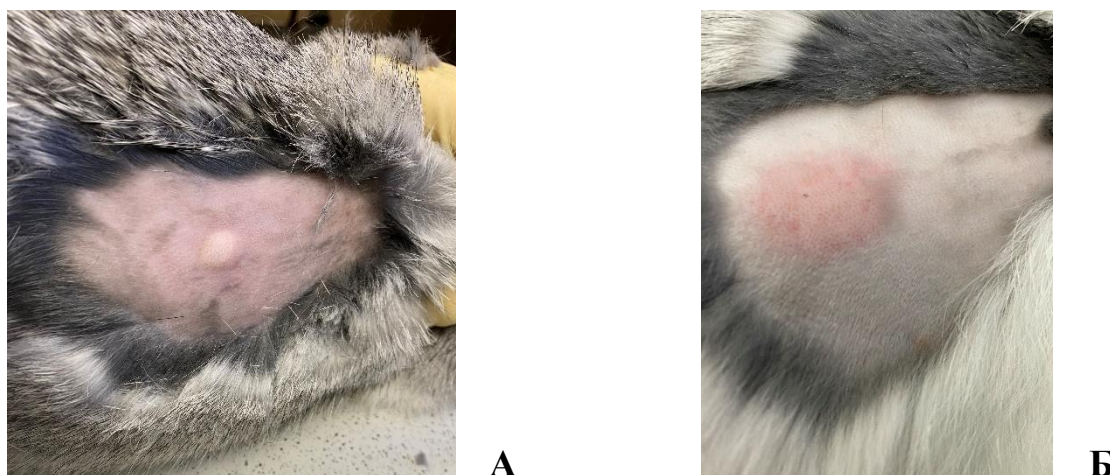


Рисунок 5 - Постановка Диаскинтест® (А), гиперемия и инфильтрат в месте постановки Диаскинтест® через 72 часа (Б)

Таблица 2 - Результаты внутрикожной пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным у экспериментальных животных

№*	Гиперемия и инфильтрат (мм)	№*	Гиперемия и инфильтрат (мм)	№*	Гиперемия и инфильтрат (мм)
1	30	8	20.0	15	20.0
2	20.0	9	25.0	16	25.0
3	15	10	23.0	17	25.0
4	25.0	11	20.0	18	22.0
5	28.0	12	20.0	19	25.0
6	20.0	13	23.0	20	25.0
7	20.0	14	20.0	21	25.0

*№ - номер животного в эксперименте

3.2.2. Результаты молекулярно-генетического исследования материала из патологических очагов

Видовую идентификацию возбудителя в образцах костной ткани кроликов осуществляли молекулярно-генетическим методом: полимеразной цепной реакцией (ПЦР) в режиме реального времени с использованием набора реагентов «Амплитуб - РВ» ООО «Синтол» (Россия).

Результаты: образцы 1 - 11, 13 - 21 - были положительными по ПЦР на ДНК МБТ, №12 - отрицательный.

3.3 ОЦЕНКА ДИНАМИКИ МАССЫ ТЕЛА

Определяются статистически значимые различия в исходных показателях веса между группой 2 и другими группами, что можно объяснить анатомо-физиологическими особенностями животных. Данные различия не позволяют оценивать абсолютные значения, поэтому производилась оценка динамики весовых прибавок. Прибавки в весе определялись у всех кроликов и составляли от 4,8 до 15,3% за весь период наблюдения (Рисунок 6). Максимальные весовые прибавки отмечаются в группах 3 и 4, получавших памидроновую кислоту: 15,3% и 7,7% соответственно за весь период наблюдения; 10,6% за период от момента хирургического лечения до выведения из эксперимента. При этом статистически достоверными различия в динамике весовых прибавок получены только в группе 3 ($p = 0,04$).

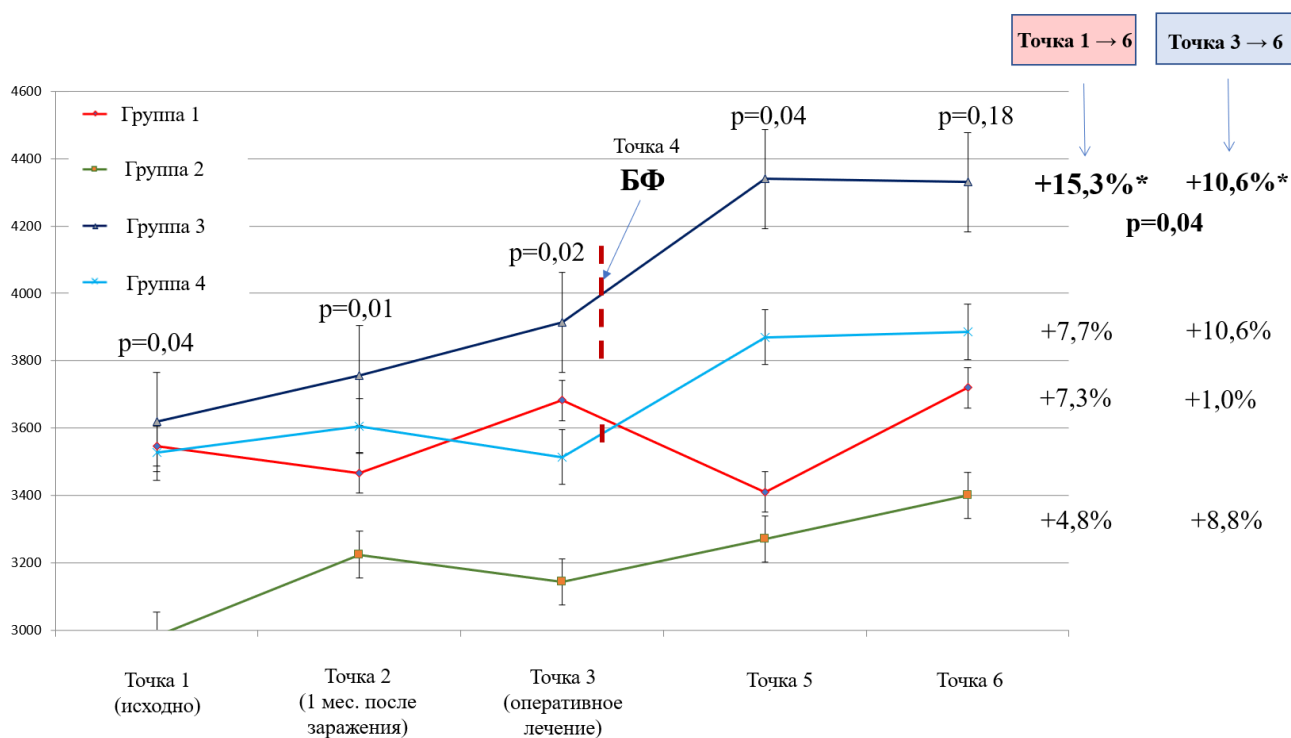


Рисунок 6 - Динамика массы тела кроликов

3.4 ОЦЕНКА ДИНАМИКИ ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

Данные биохимического исследования венозной крови кроликов представлены в Таблице 1.

Во всех группах в динамике определяется угнетение активности *общей щелочной фосфатазы* (Рисунок 7), при этом корреляция с данными последующих исследований отсутствует.

Статистически значимые различия между группами определяются по уровню *склеростина* при измерении через 3 месяца после хирургического лечения ($p = 0,03$), с максимальным значением в контрольной группе (505,8 пмоль/л). Высокое значение данного показателя в группе 3 (405,2 пмоль/л) требует сопоставления с лучевыми и морфологическими данными (Рисунок 8).

Для остеокальцина, альбумина, RANKL, СТХ статистически значимые различия между группами и в динамике внутри групп отсутствуют, с результатами других исследований не коррелируют.

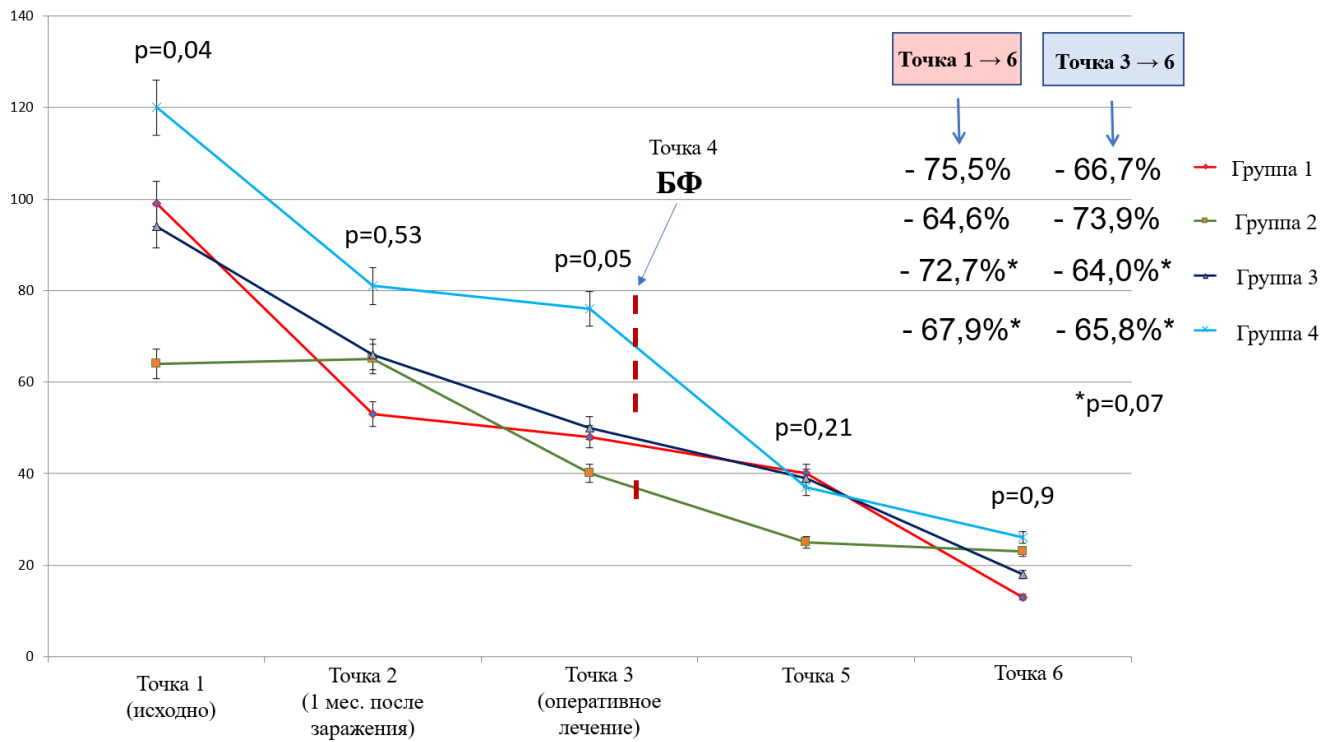


Рисунок 7 - Динамика уровня общей щелочной фосфатазы

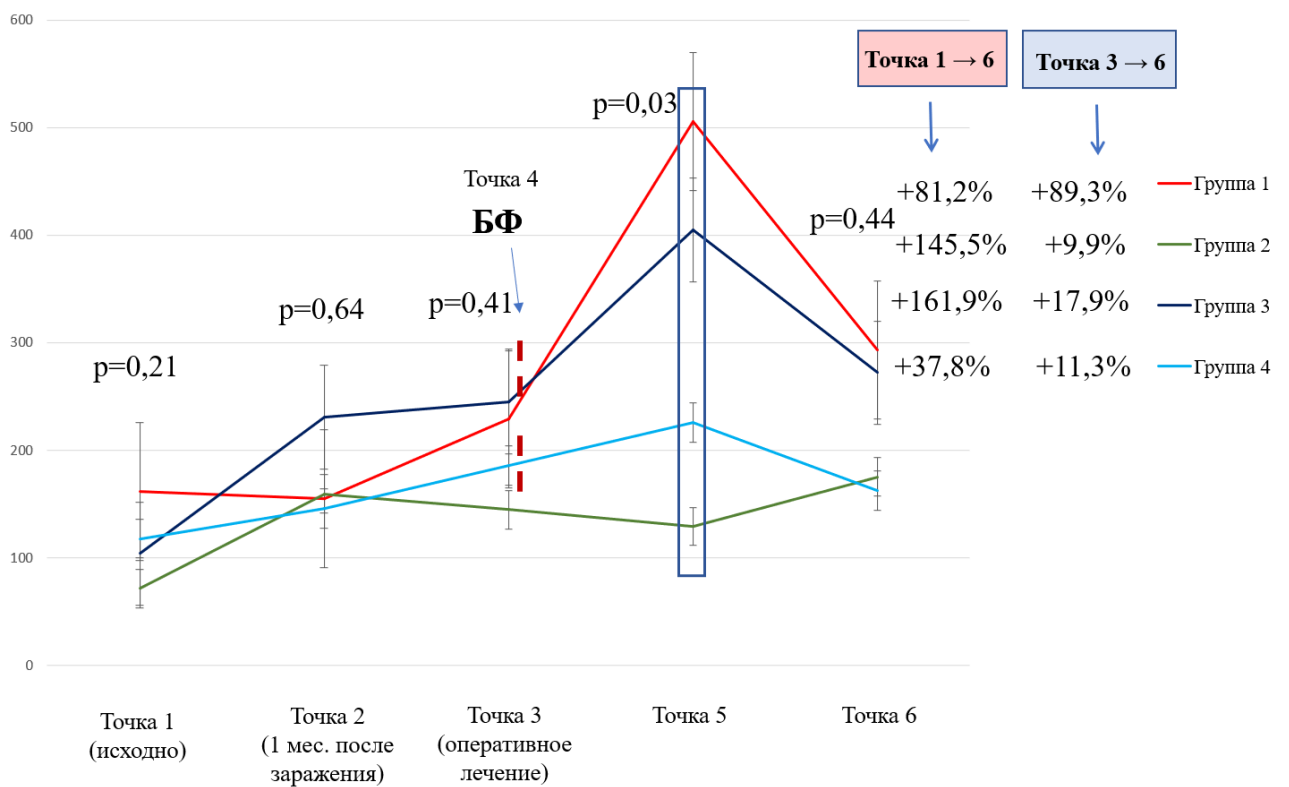


Рисунок 8 - Динамика уровня склеростина

3.5 РЕЗУЛЬТАТЫ ЛУЧЕВОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Получены компьютерные томограммы 21 правой бедренной кости и 11 левых интактных бедренных костей. Выполнена количественная и качественная оценка зоны имплантации, контралатерального мыщелка правой бедренной кости, медиального мыщелка левой бедренной кости.

3.5.1 Результаты исследования интактных бедренных костей

Выполнен анализ структуры, архитектоники и костной плотности интактных (левых) бедренных костей. Детальное описание представлено на примере препарата №4 из группы 2 (кролик, не получавший БФ, не имеющий активного туберкулезного процесса по данным исследования правой бедренной кости). Размеры препарата и толщина кортикального слоя представлены на Рисунке 9. Максимальное количество и структурность костных трабекул выражена в мыщелках бедренной кости, с постепенным снижением данных параметров по направлению к центральным отделам кости и проксимально к метафизарной пластинке. Метафизарная пластинка достаточно визуализируется и является границей с костно-мозговым каналом. Средние значения плотности тканей по данным измерений в 10 точках представлены на Рисунке 9 для кортикального слоя, медиального и латерального мыщелков. Указанные параметры имеют ограниченную вариативность при анализе других препаратов. У некоторых образцов разряжение трабекулярной структуры в центральных отделах принимает вид полостей (Рисунок 10).

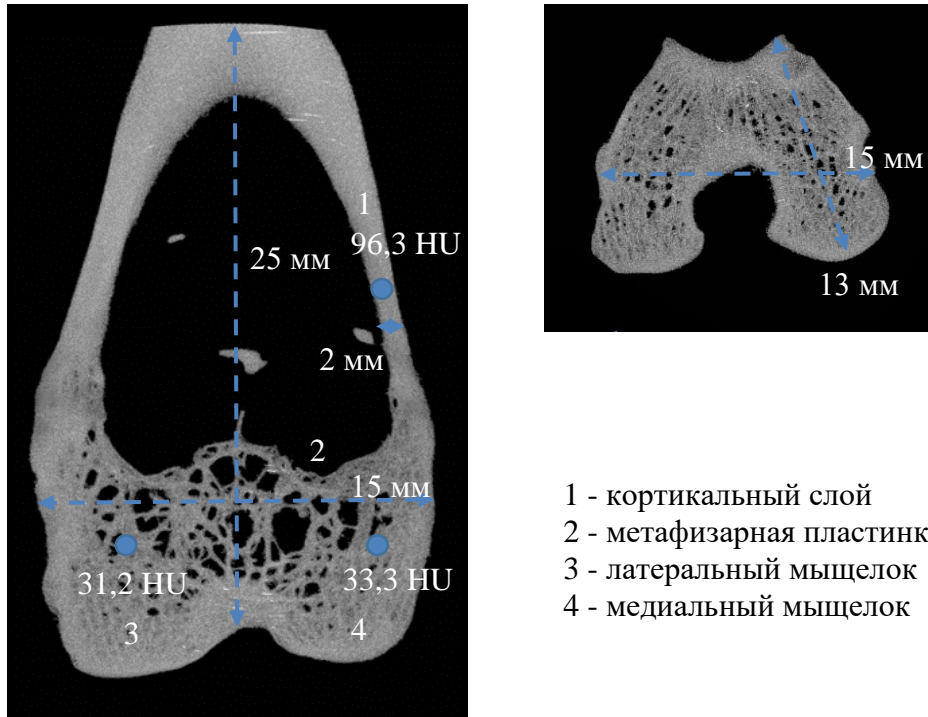


Рисунок 9 - Архитектоника костной ткани дистального эпиметафиза интактной (левой) бедренной кости кролика; размеры и плотность костной ткани (на площади 0,001 см², HU) по данным микроКТ

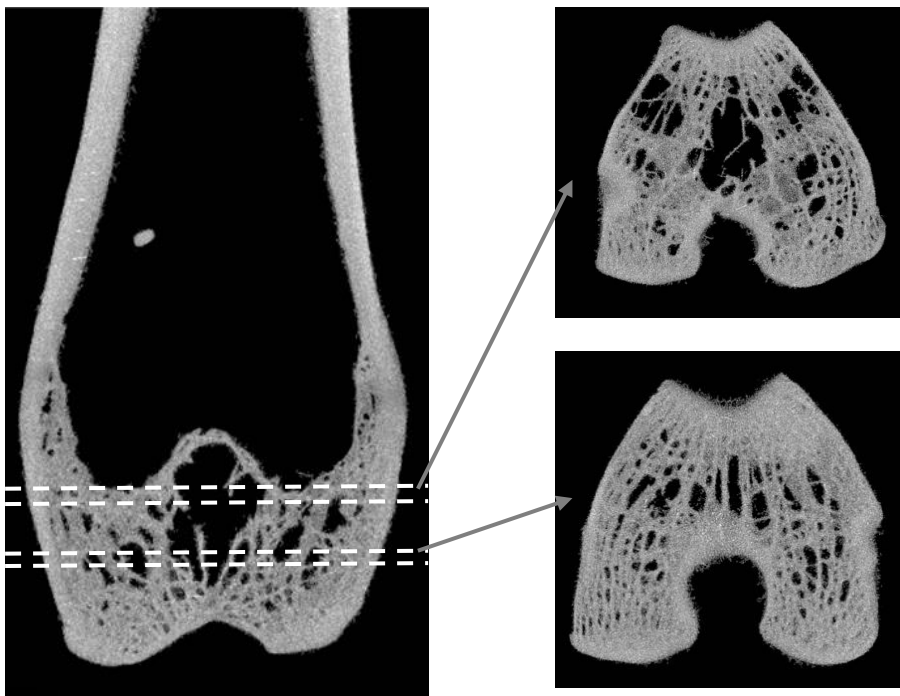


Рисунок 10 - Вариативность структуры дистального эпифиза бедренной кости по данным микроКТ

3.5.2. Качественные данные

Во всех опытных группах определяется вариативность положения имплантата, выраженности процессов остеорегенерации и интеграции имплантата (Рисунок 11).



Группа 2, №2



Группа 3, №6



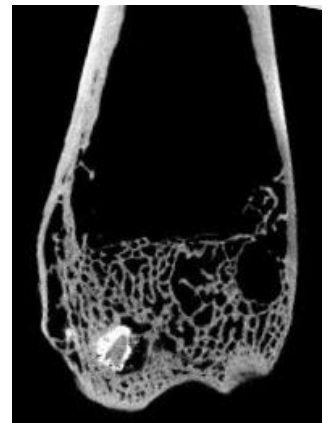
Группа 4, №7



Группа 2, №15



Группа 3, №14



Группа 4, №1

Рисунок 11 - Вариативность КТ-изображений положения имплантата и структуры костной ткани препаратов бедренных костей

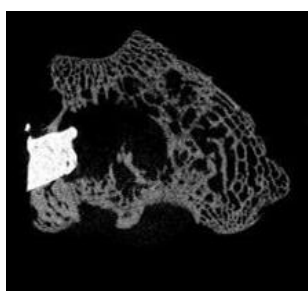
Группа 1 (характеристика группы)

При анализе МикроКТ контрольной группы (№3, 17, 20) во всех образцах определяется наличие костного цемента в месте внедрения инфекта (Рисунок 12). Имеется вариативность расположения цементной пломбы: в зоне эпифизарной пластинки (№3), сразу под эпифизарной пластинкой (№17), дистальнее эпифизарной пластинки (№20). В препарате №3, аутопсированном через 4,5 месяца после заражения, сохранена структурность костных балок и эпифизарной пластинки, имеется зона дефекта кортикального слоя проксимальнее цементной пломбы, краевые костные разрастания в диафизарном отделе по медиальной поверхности бедренной кости. Препараты №17 и 20 аутопсированы через 7,5 месяцев после инфицирования. В бедренной кости кролика №17 сохранена структурность костных балок, прослеживается замыкательная пластинка, отсутствуют резорбция вокруг цементной пломбы и костные разрастания. Эпиметафиз препарата №20 резко деформирован, дифференциация костных балок, кортикального слоя, эпифизарной пластинки отсутствуют, кортикальный слой в метафизарной зоне истончен, целостность его нарушена. Выражены краевые костные разрастания, определяются зоны резорбции вокруг цементной пломбы, обширные полости в эпиметафизе, множественные секвестры.

Особенностью данной группы является нарастание в динамике КТ-признаков туберкулезной деструкции с максимальной их выраженностью через 7,5 месяцев от момента инфицирования (№20). Сохранение структуры эпифиза в образце №17 требует сопоставления с морфологическими данными на предмет развития специфического процесса, из дальнейшего анализа образец исключен.

3 месяца

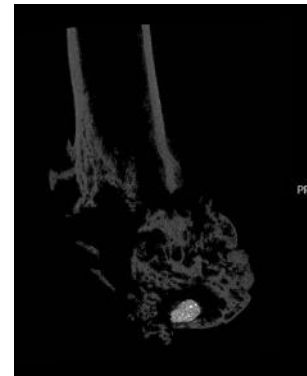
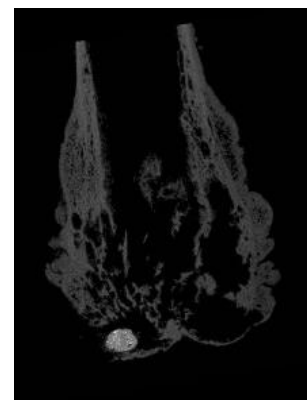
6 месяцев



№3



№17



№20

Рисунок 12 – КТ-изображения дистального эпифиза правой бедренной кости, препараты группы 1

Группа 2 (характеристика группы)

Анализ МикроКТ экспериментальной группы 2 на сроке выведения через 3 месяца после хирургического лечения с применением костной пластики (Рисунок 13) демонстрирует:

- кролик №8: отсутствие структурности костных балок, наличие полости с секветрами и склерозированным контуром в проекции оперативного доступа, нарушение целостности кортикального слоя в зоне трепанации. Костный имплантат не визуализируется. Эпифизарная замыкательная пластинка частично разрушена по ходу остеорезекции;

- кролик №15: отсутствие структурности костных балок в центральных отделах эпиметафиза, сохранение пострезекционной полости, при этом трепанационный дефект кортикального слоя не визуализируется. Определяется частичная миграция имплантата в центральные отделы, прорастание имплантата костными балками отсутствует. Имеются краевые костные разрастания.

На сроке выведения 6 месяцев после костной пластики (Рисунок 13):

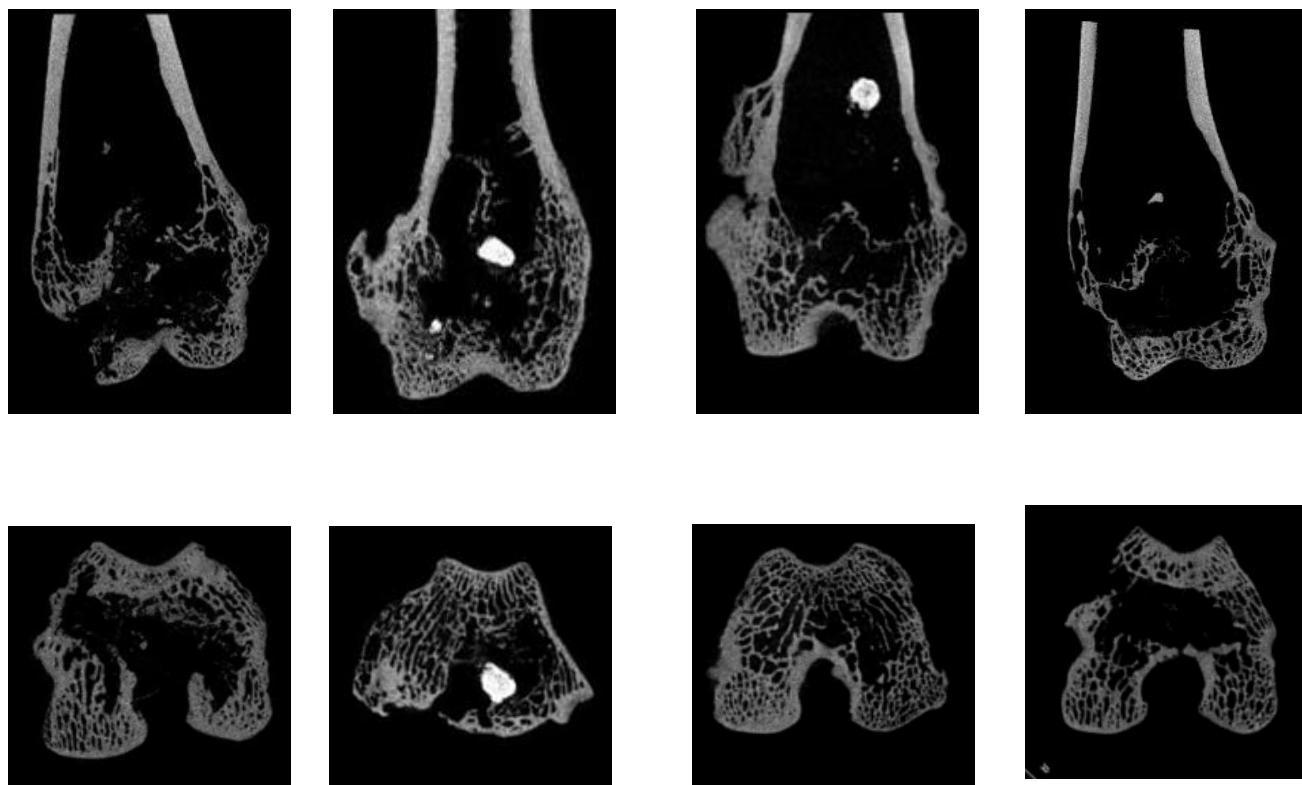
- кролик №2: визуализируется структурность костных балок и эпифизарной пластинки, отсутствует пострезекционная полость с сохранением некоторого разрежения костных балок в зоне оперативного вмешательства, миграция имплантата в костно-мозговой канал. Целостность кортикального слоя не нарушена. Выражены краевые костные разрастания;

- кролик №4: пострезекционная полость полностью сохранена, стенки ее не склерозированы, секвестры не определяются. Костные балки в зоне оперативного доступа отсутствуют, эпифизарная пластинка частично разрушена. Кортикальный слой в зоне трепанации представлен единичными костными балками, в метафизарном отделе истончен. Имплантат не визуализируется.

Особенностью данной группы является наличие костных полостей, отсутствие структурности костной ткани в 75% случаев. На сроке наблюдения 6 месяцев имплантат в эпифизе отсутствует в 100% случаев, восстановление структуры костной ткани определяется у 50% образцов.

3 месяца

6 месяцев



№8

№15

№2

№4

Рисунок 13 - КТ-изображения дистального эпифиза правой бедренной кости, препараты группы 2

Группа 3 (характеристика группы)

МикроКТ-исследование экспериментальной группы 3 на сроке выведения через 3 месяца показало (Рисунок 14):

- кролик №10: костные балки структурны, целостность эпифизарной пластинки сохранена. Кортикальный слой в зоне трепанации полностью восстановлен. Костные секвестры отсутствуют. Имплантат визуализируется фрагментарно в эпифизарном отделе кости, где определяется прорастание его костными балками, а также в центральных отделах под эпифизарной пластинкой. Присутствуют умеренно выраженные краевые костные разрастания;

- кролик №18: структурность костных балок и целостность замыкательной пластинки отсутствуют по ходу пострезекционной полости, которая полностью сохранена. Стенки полости склерозированы, содержимым являются мелкие костные секвестры и фрагменты имплантата. Определяется трепанационный дефект в кортикальном слое. Выражены краевые костные разрастания;

- кролик №21: структурность костных балок в центральных отделах кости и целостность замыкательной пластинки отсутствуют, при этом в мышелках структура костных балок выражена. Пострезекционная полость не определяется, секвестров нет. В метафизарном отделе визуализируется имплантат со склерозом костной ткани по периферии, периимплантной резорбции нет. Определяется прорастание имплантата костными балками. Кортикальный слой истончен в проекции трепанации. Краевые костные разрастания не выражены.

Через 6 месяцев выявлены следующие особенности (Рисунок 15):

- кролик №5: структура костных балок и эпифизарной замыкательной пластинки сохранена, имеющиеся полости в центральном и проксимальном отделе эпифиза являются вариантом нормальной структуры бедренной кости кролика, о чем говорит их небольшой размер и отсутствие четкого контура, характерного для пострезекционной полости. Имплантат визуализируется фрагментарно, в том числе в костно-мозговом канале. Фрагменты имплантата в метафизарной зоне прорастают костными балками. Трепанационный дефект кортикального слоя полностью восстановлен. Краевые костные разрастания не выражены;

- кролик №6: полностью сохранена пострезекционная полость, стенки ее склерозированы, костные балки в зоне оперативного вмешательства и эпифизарная пластинка отсутствуют. Полость содержит единичные костные секвестры и фрагменты имплантата. Кортикальный слой в проекции трепанации нарушен. Выражены краевые костные разрастания;

- кролик №11: сохранена пострезекционная полость, контур ее четкий, не склерозирован. Эпифизарная пластинка частично разрушена по ходу оперативного доступа. Имплантат не визуализируется. Определяются мелкие костные секвестры. Нарушена целостность кортикального слоя в проекции трепанации. Краевые костные разрастания отсутствуют;

- кролик №14: структурность костных балок в мышелках бедренной кости выражена, несколько нарушена в центральных отделах. Эпифизарная пластинка частично сохранена. Костные полости и секвестры не определяются. Замыкательная пластинка прослеживается. Имплантат определяется в медиальной мышелке, прорастает костными балками. Трепанационный дефект кортикального слоя полностью восстановлен. Краевых костных разрастаний нет.

Особенностями данной группы является, с одной стороны визуализация имплантата и/или его фрагментов у 85,7 % образцов и прорастание имплантата костными балками, с другой – выявление костных полостей в 50% случаев.

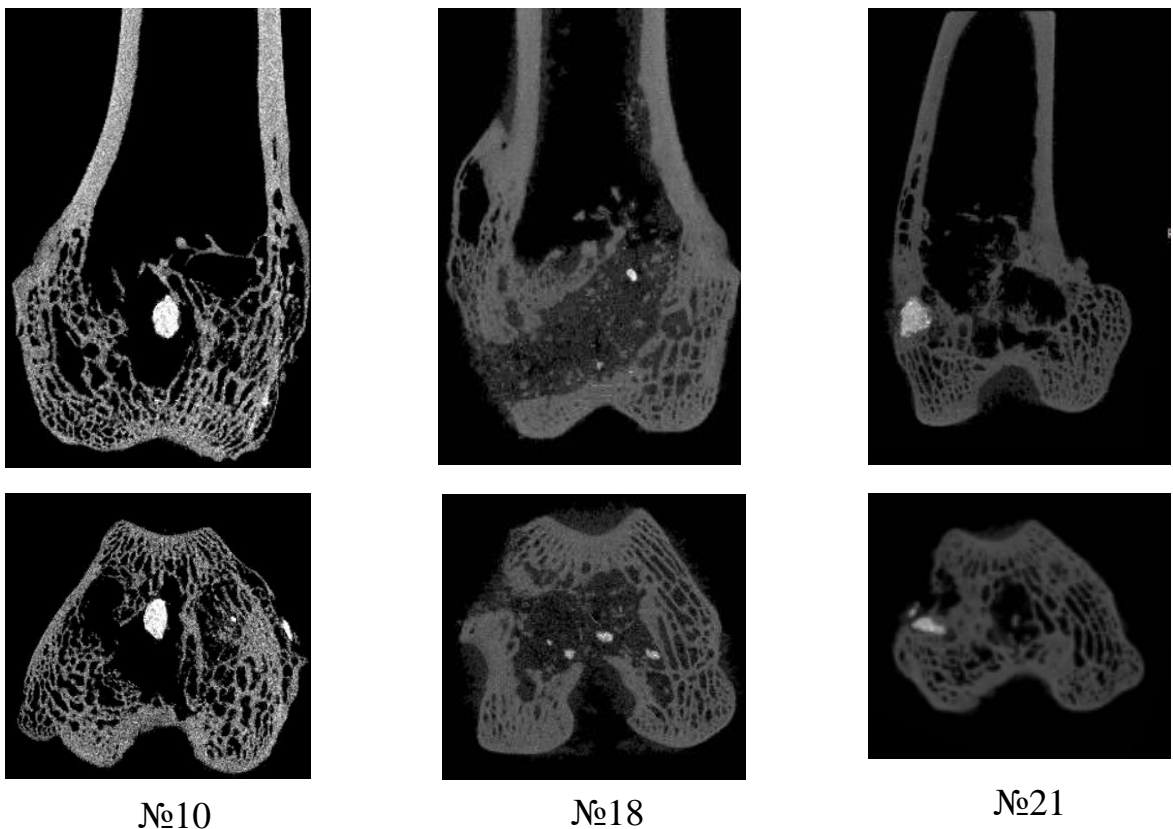


Рисунок 14 - КТ - изображения дистального эпифиза правой бедренной кости, препараты группы 3, 3 месяца наблюдения

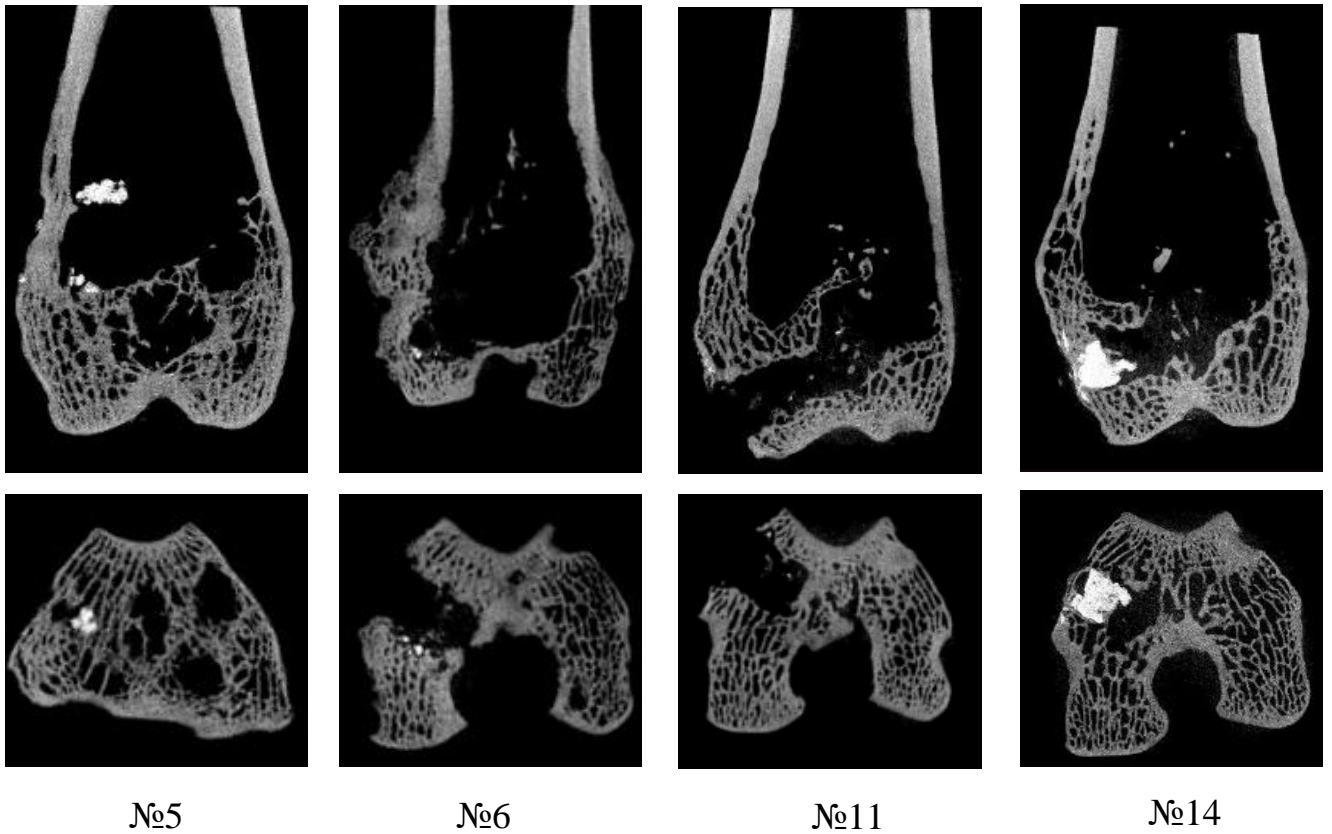


Рисунок 15 - КТ - изображения дистального эпифиза правой бедренной кости, препараты группы 3, 6 месяцев наблюдения

Группа 4 (характеристика группы)

На сроке выведения через 3 месяца (Рисунок 16):

- кролик №13: пострезекционная полость не определяется, структурность костных балок выраженная, эпифизарная пластинка сохранена. Имплантат располагается в эпиметафизарном отделе, прорастает костными балками, периимплантной резорбции нет. Структура кортикального слоя не нарушена. Краевые костные разрастание незначительные;

- кролик №16: сохраняется пострезекционная полость, стенки которой не склерозированы, содержимое ее неоднородное, содержит мелкие костные секвестры. Структура эпифизарной пластинки и костных балок нарушена. Имплантат фрагментирован, определяется периимплантная резорбция. В зоне

трепанации структура кортикального слоя не восстановлена. Краевые костные разрастания не выражены;

- кролик №19: структура костной ткани нарушена, определяется пострезекционная полость с неоднородным содержимым, костными секвестрами и мелкими фрагментами имплантата, стенки ее не склерозированы. Структура эпифизарной пластинки нарушена. Кортикальный слой в зоне трепанации и метафизарного отдела истончен. Выражены краевые костные разрастания.

Через 6 месяцев (Рисунок 17):

- кролик №1: пострезекционная полость не определяется, имеются зоны разряжения костных балок в латеральном мыщелке. Структура костных балок выражена удовлетворительно, эпифизарная пластинка прослеживается на всем протяжении. Имплантат располагается в медиальном мыщелке, прорастает костными балками. Структура кортикального слоя не нарушена. Краевые костные разрастания выражены умеренно.

- кролик №7: сохранена пострезекционная полость, стенки ее склерозированы, костные секвестры не определяются. Костные балки утолщены, структура их нарушена. Эпифизарная пластинка прослеживается не на всем протяжении. Сохраняется трепанационный дефект в кортикальном слое. Наблюдается миграция имплантата в костно - мозговой канал. Краевые костные разрастания выражены умеренно.

- кролик №9: определяется пострезекционная полость в эпиметафизарном отделе с разрушением эпифизарной пластинки, стенки полости не склерозированы, секвестров нет. Структурность костных балок в эпифизе нарушена. Имплантат представлен мелкими фрагментами в эпифизе, прорастает костными балками, периимплантной резорбции нет. Целостность кортикального слоя нарушена в зоне трепанации. Краевые костные разрастания выражены умеренно;

- кролик №12: пострезекционная полость сохранена частично, стенки ее не склерозированы, содержимое неоднородное, имеется дефект в эпифизарной

пластинке по ходу оперативного доступа. Костный имплантат расположен в медиальной мышцелке, частично прорастает костными балками, периимплантной резорбции нет. Целостность кортикального слоя не нарушена. Краевые костные разрастания незначительные.

Особенностями данной группы является обнаружение имплантата и/или его фрагментов в 100% случаев, выраженное прорастание имплантата костными балками (Рисунок 18). Костные полости, определяемые на сроке наблюдения 3 месяца, содержат неоднородное содержимое, костные секвестры, тогда как при наблюдении через 6 месяцев, секвестры определяются только в 1 случае и в небольшом количестве.

Отличительными признаками экспериментальных групп №№3 и 4 является обнаружение имплантата в 85,7 - 100% случаев даже при наличии костных полостей, тогда как в группе 2 имплантат определяется лишь в 50% случаев и лишь в 25% располагается в эпифизе. Также только в группах №№3 и 4 определяется прорастание имплантата костными балками.

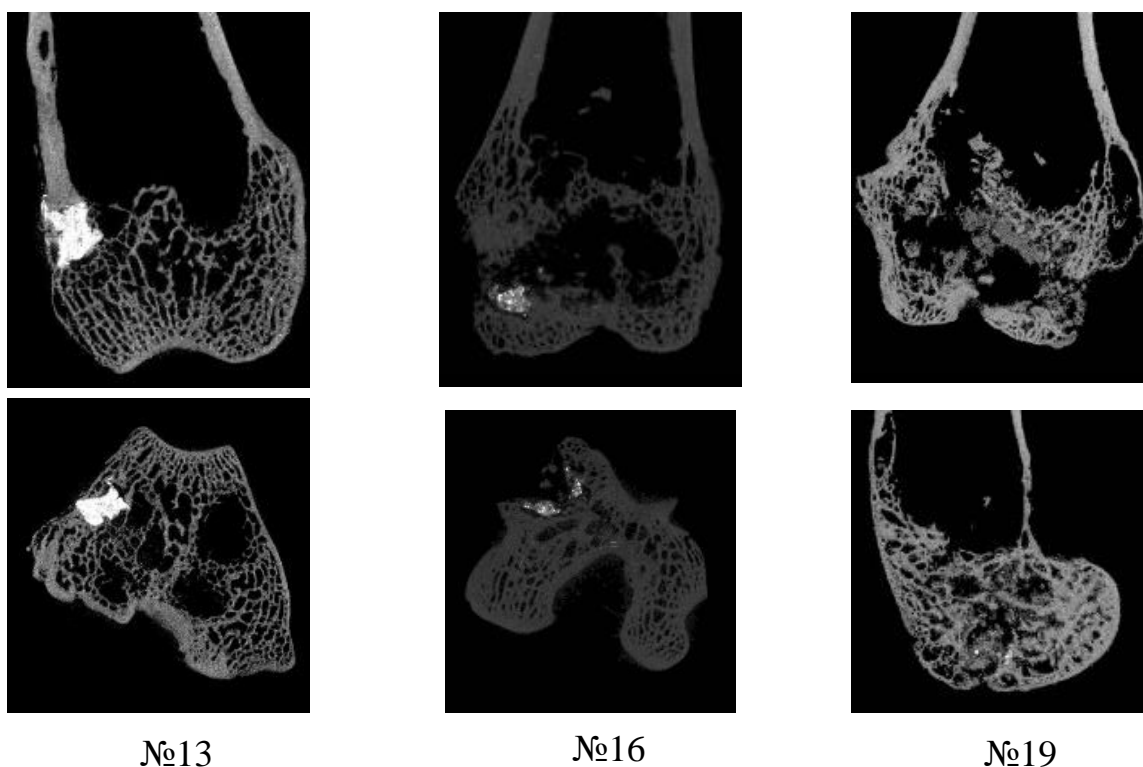


Рисунок 16 - КТ-изображения дистального эпифиза правой бедренной кости, препараты группы 4, 3 месяца наблюдения

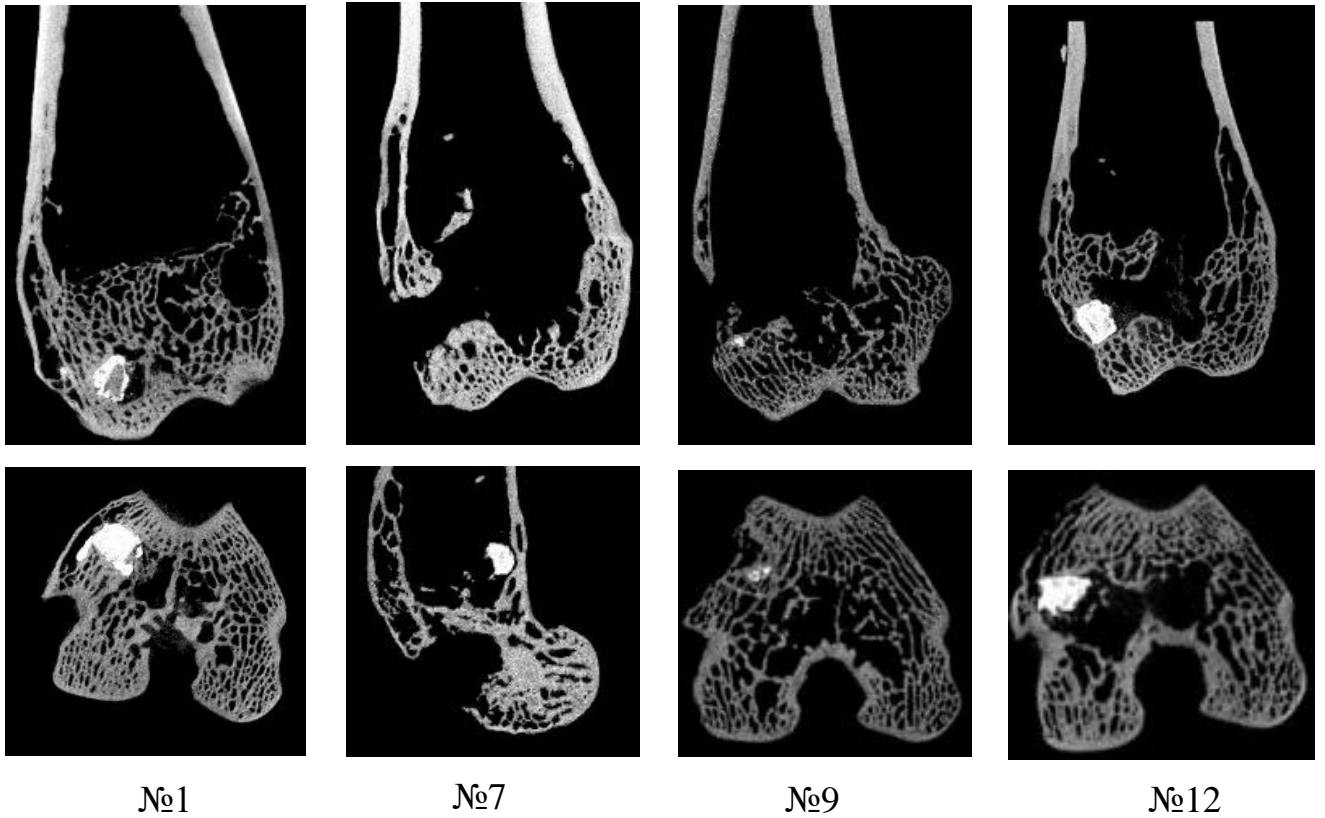


Рисунок 17 - КТ-изображения дистального эпифиза правой бедренной кости, препараты группы 4, 6 месяцев наблюдения

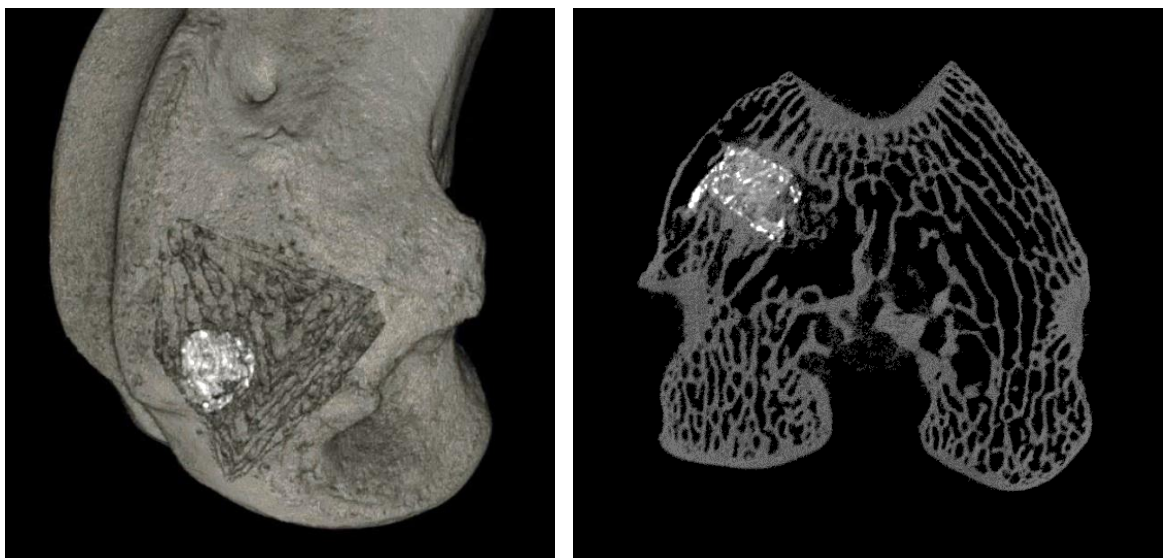


Рисунок 18 - КТ-изображение дистального отдела правой бедренной кости кролика группы 4 на сроке аутопсии 6 месяцев (А – 3D-реконструкция, Б – КТ-срез). Имплантат имеет неоднородную плотность, включения CaSO_4 , прорастает костными балками; периимплантной резорбции нет

Особенности препаратов экспериментальной серии.

При анализе серии обращено внимание на следующие особенности, связанные с техникой оперативного вмешательства, которые потенциально могут повлиять на результат эксперимента:

- в условиях эксперимента не выполнялся рентгенологический пред- и интраоперационный контроль с целью определения объема и структуры деструктивных полостей и контроля объема резекции, что могло повлиять на сохранение инфекта и развитие рецидива специфического воспаления;

- форма и размер пострезекционной полости зависят от техники выполнения кюретажа: резекция выполнялась в пределах здоровых тканей костными ложками Фолькмана, распространение инфекционного процесса могло влиять на размер полости, однако форма и ориентация полости определялась размером трепанационного дефекта и углом введения костной ложки (Рисунок 19);

- односторонний дефект в эпифизарной пластинке обусловлен интраоперационным повреждением и всегда соответствует траектории формирования полости резекции;

- интраоперационно для выполнения пластики дефекта использовались 1 - 3 гранулы имплантата в зависимости от размера полости, однако во всех препаратах визуализируется не более 1 фрагмента имплантата крупного размера.

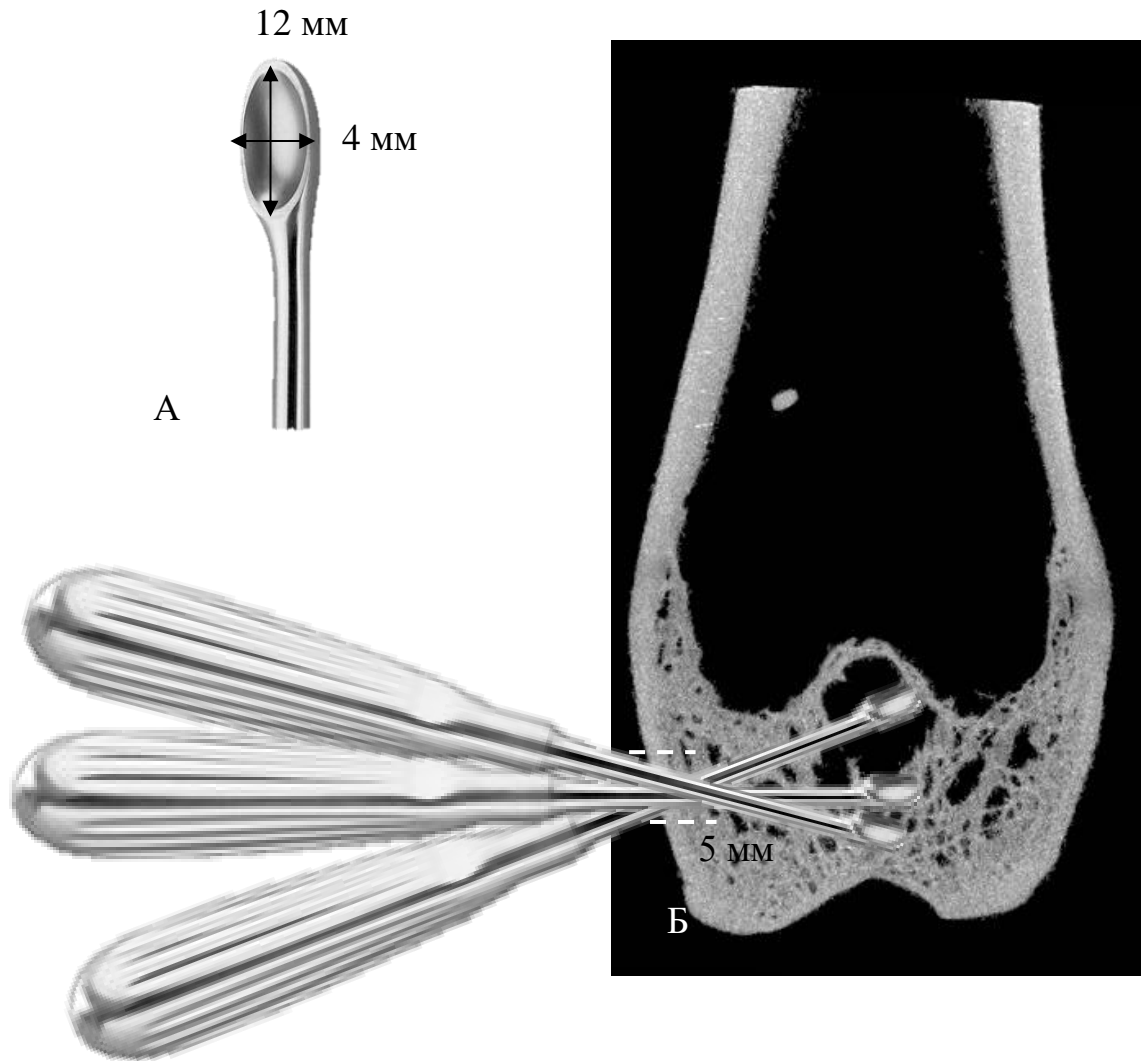


Рисунок 19 - Параметры костной ложки Фолькмана (А), схема техники выполнения кюретажа (Б)

3.5.3. Количественные данные

Определение костной плотности выполнялось в программе RadiAnt DICOM Viewer в единицах Хаусфилда на площади $0,001 \text{ см}^2$. В зависимости от условий калибровки томографа минимальные значения плотности мягких тканей внутри кости для разных образцов составляли 0 или - 1000 HU. При минимальном значении 0, плотность костной ткани на площади $0,001 \text{ см}^2$ в интактной зоне медиального мышечка правой бедренной кости находилась в диапазоне $10,2 \div 28,7$ HU, при - 1000 являлась отрицательной величиной в диапазоне - 250HU - 770HU. Плотность имплантата при этом всегда являлась положительной ($27 \div 1117$ HU) и

принимала максимальные значения в группе 4 (Рисунок 20). Учитывая разнородность полученных данных, метод в дальнейшем анализе не использовался.

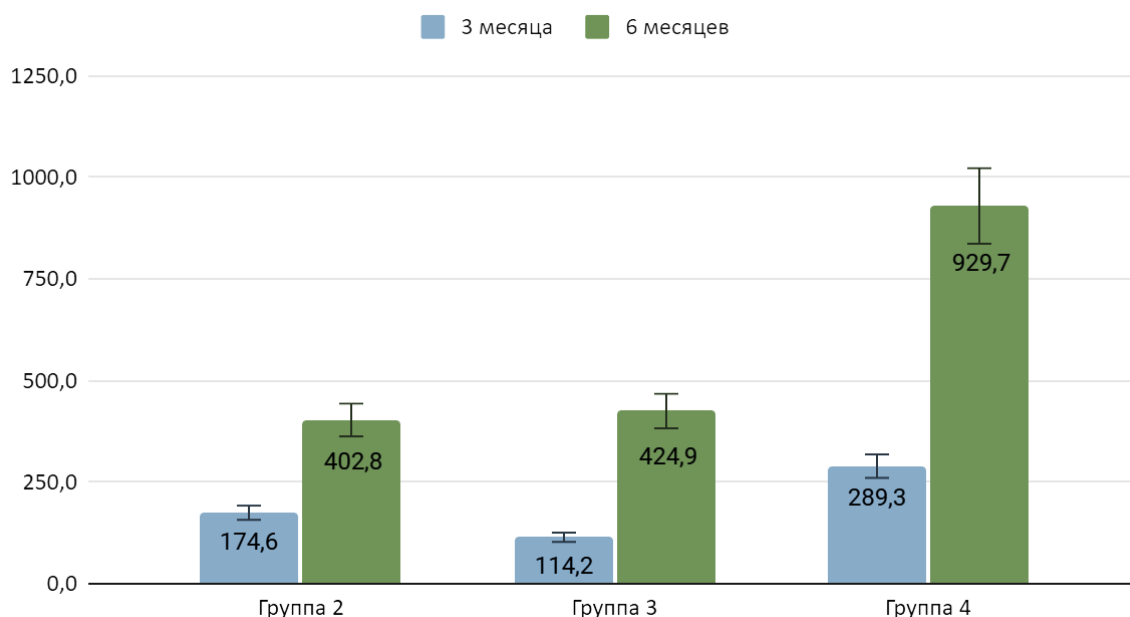


Рисунок 20 - Плотность имплантата на площади 0,001 см² на срез 1 мм по данным микроКТ, Ме

3.5.4. Полуколичественная оценка признаков остеорегенерации и остеолизиса

Выполнена оценка таких лучевых признаков остеорегенерации, как расположение и прорастание имплантата костными балками, восстановление структуры кортикальной замыкательной и эпифизарной пластинок, структурность костных балок; признаков остеолизиса – наличие костных полостей, микросеквестров. Оценка проводилась в баллах от 0 до 2, где 0 – признак отсутствует, 1 – умеренно выражен, 2 – ярко выражен (Таблица 3).

Во всех экспериментальных группах в динамике отмечается нарастание суммы баллов признаков *остеорегенерации* (Рисунок 21 - Балльная оценка лучевых признаков остеорегенерации и остеолизиса, Ме, сумма баллов), в то время как снижение суммы баллов *остеолизиса* - в группах 2 и 4. На сроке наблюдения

3 месяца минимальные значения остеорегенерации определяются в группе 2 (2,5 балла), максимальные значения остеолизиса - в группе 4 (4 балла). На сроке 6 месяцев обращает на себя внимание группа 4 с максимальными значениями остеорегенерации (7,5 баллов) и минимальными – остеолизиса (0,5 балла).

Таблица 3 - Лучевые признаки остеорегенерации и остеолизиса

Группа	Период наблюдения, мес.	Признаки остеорегенерации (баллы 0 - 2, Me)						Признаки остеолизиса (баллы 0 - 2, Me)		
		Визуализация имплантата в эпифизе	Прорастание имплантата костными балками	Структурность костных балок	Структурность эпифизарной пластинки	Формирование кортикальной замыкающей пластинки в месте трепанации	Сумма баллов	Костные полости	Микросеквестры	Сумма баллов
1	3			1	1	0	2	2	1	3
	6			0	0	0	0	2	2	4
2	3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	2,5	2	1,5	3,5
	6	0	0	1	1,5	1,5	4	1	1	2
3	3	2	1	1	0	1	5	1	1	2
	6	1	1	1,5	1	1	5,5	1	1	2
4	3	2	0	0	2	0	4	2	2	4
	6	2	1	1,5	1,5	1,5	7,5	0,5	0	0,5

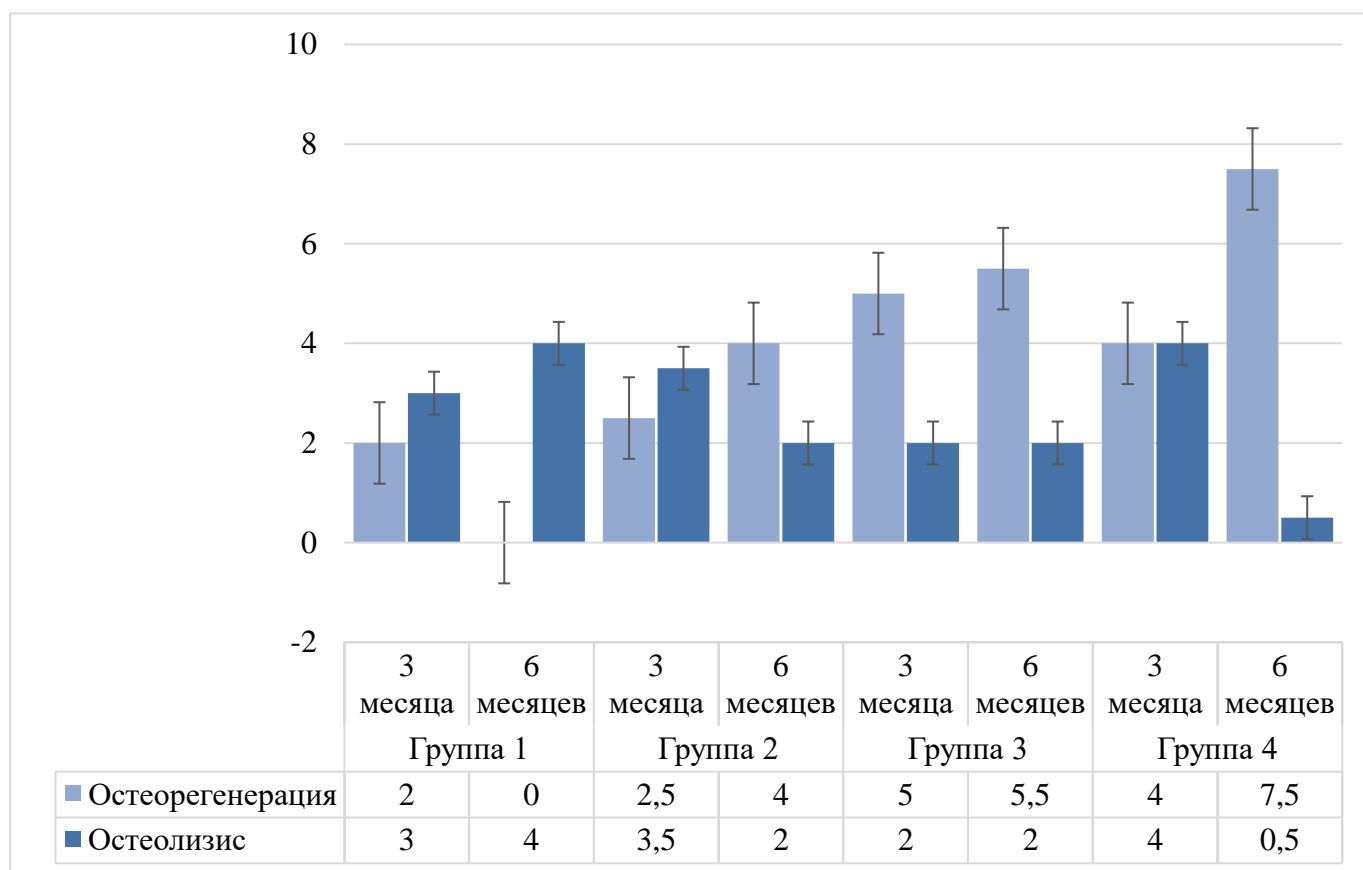
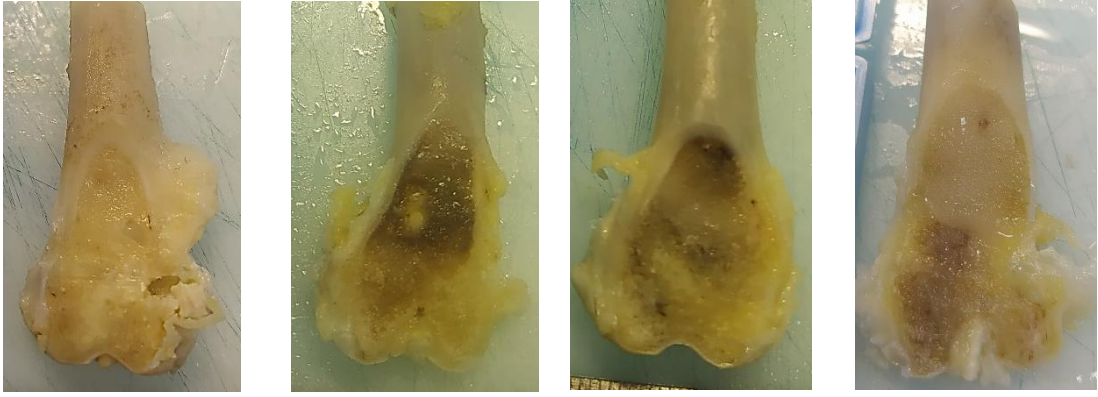


Рисунок 21 - Балльная оценка лучевых признаков остеорегенерации и остеолизиса, Ме, сумма баллов (на основе Таблицы 3)

3.6 РЕЗУЛЬТАТЫ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.6.1 Макроскопическая оценка

Определяется вариативность макроструктуры препаратов между группами и внутри групп (Рисунок 22, Рисунок 23). Краевые костные разрастания отсутствуют в интактных левых бедренных костях, в правых бедренных костях определяются у 16 из 18 животных (88,9%).



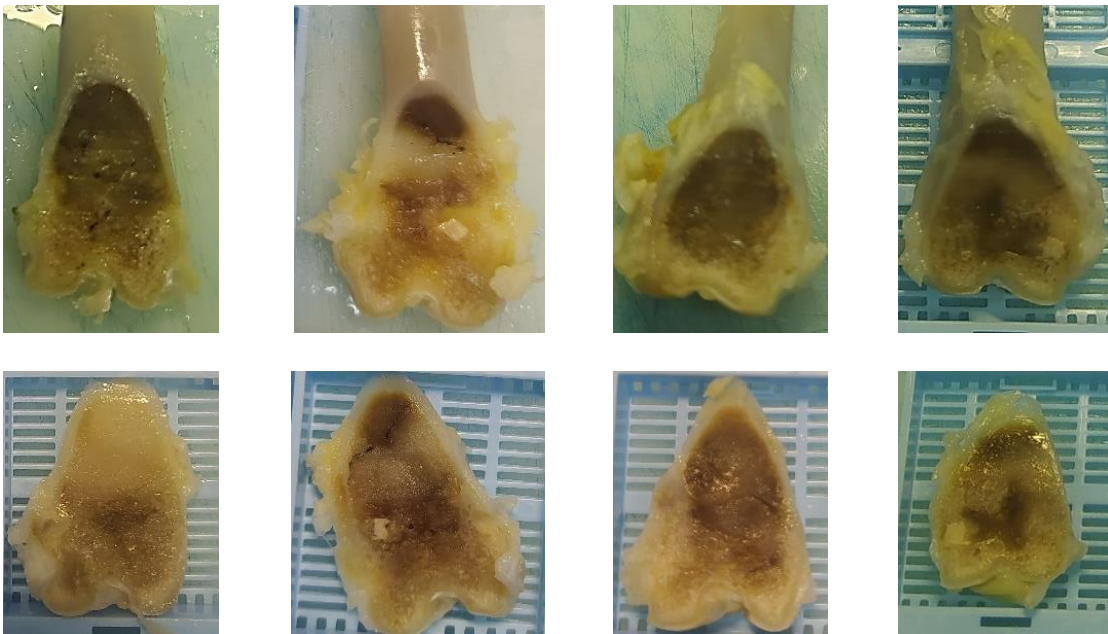
Группа 1, №3

Группа 2, №2

Группа 3, №18

Группа 4, №19

Рисунок 22 - Макропрепараты правых бедренных костей (3 месяца наблюдения)



№1

№7

№9

№12

Рисунок 23 - Вариативность макроструктуры препаратов группы 4 (6 месяцев наблюдения)

3.6.2 Результаты исследования интактных бедренных костей

Дистальный эпифиз интактных левых бедренных костей аутопсирован у 12 животных через 6 месяцев после оперативного лечения. Морфометрический анализ выполнен у 4, репрезентативных для каждой группы, образцов.

Ни в одном случае не выявлено специфического поражения, отсутствовали инфильтративные изменения, признаки ремодуляции и фиброзирование. Суставная поверхность представлена гиалиновым хрящом правильного гистологического строения с гладкой поверхностью, отчетливым остеохондральным переходом без дистрофических изменений. Кортикальная кость в эпифизарной зоне представлена зрелой пластинчатой костной тканью с хорошо визуализирующимися остеонными структурами и гаверсовыми каналами. Надкостница умеренно васкуляризована, нормального гистологического строения, без признаков воспаления.

В зоне дистального эпифиза бедренной кости трабекулярное строение сохранено, костные балки формируют петлистую сеть, заполняющую пространство всей эпифизарной зоны (Рисунок 24). Общая площадь, занимаемая костными балками в эпифизарной области составляет 24,0% (18,0; 29,0) при средней толщине костных балок 117,8 (106,3; 122,8) мкм.

Метаэпифизарная пластинка представлена зрелыми костными балками, выражена слабо.

На поверхности костных трабекул обнаруживались в основном покоящиеся остеобласты (Рисунок 25). Доля активных остеобластов составляет 0,3 от числа клеток эндостальной зоны, доля активных остеоцитов - 0,2 от общего количества остеоцитов. Имеется разброс данных клеточного состава препаратов в разных группах (Рисунок 26).

Межбалочное пространство эпифизарной зоны представлено ретикулярной стромой с адипоцитами, встречаются единичные клетки костного мозга, в большинстве представлены лимфоцитами и гранулоцитами, редко моноцитами/макрофагами. Встречаются локальные участки с повышенной клеточностью.

Сосудистая сеть развита, представлена сосудами различного калибра венозного и артериального типа. В диафизе костный мозг нормального гистологического строения, определяются клетки всех ростков гемопоэза на всех стадиях развития, соотношение гемопоэтического и жирового компонентов 50/50.

5000 μm



Рисунок 24 - Отсканированное изображение микропрепарата (А, окраска гематоксилином и эозином) и КТ-срез макропрепарата (Б) эпифиза левой (интактной) бедренной кости (препарат контрольной группы, кролик №7)

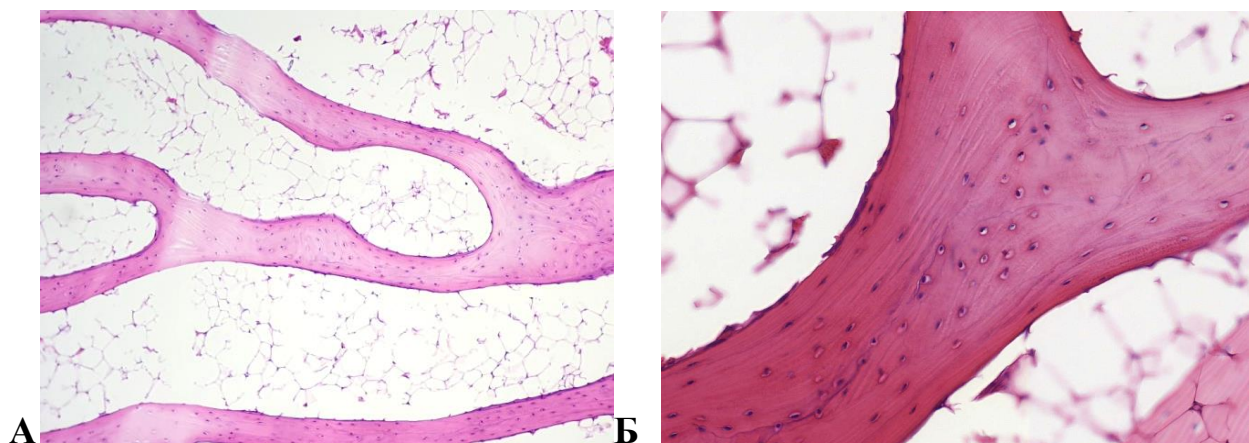


Рисунок 25 - Костные балки образцов контрольной группы (А, ув. х 100), эндостальная зона с неактивными остеобластами (Б, ув. X 400), окраска гематоксилином и эозином

Особенности исследования

Обращает на себя внимание различное соотношение толщины костных балок и остеоформирующих клеточных элементов в разных группах при относительно схожей макроскопической картине и общей костной плотности (Рисунок 26):

- на фоне отсутствия как оперативного, так и медикаментозного лечения (группа 1) определяется минимальная площадь костной ткани (17%) и толщина костных балок (98 мкм), максимальное количество остеобластов - 11,2 в п/зр. (Ме (25%; 75%) = 9,5 (8,25; 13,5), $p < 0,05$), в том числе активных - 4,7 в п/зр. (5,0 (1,75; 6,0), $p < 0,05$), среднее количество остеоцитов - 10,6 в п/зр. (10,5 (9,0; 12,0)), что может свидетельствовать об активации естественных репаративных процессов, индуцированных ответом организма на туберкулезную инфекцию;

- в препаратах оперированных животных, получавших противотуберкулезную терапию (группы 2 и 3), площадь костной ткани составила 26 и 24,5%, толщина костных балок 114,5 и 121 мкм, количество остеобластов 6,6 в п/зр. (7,0 (5,25; 7,0)) и 6,1 в п/зр. (6,0 (4,25; 7,0)) соответственно, пул остеоцитов при этом представлен преимущественно неактивными клетками (12 и 14% активных клеток). Схожие данные могут быть объяснены преобладанием эффекта угнетения остеогенеза противотуберкулезной терапией над эффектом торможения резорбции костной ткани бисфосфонатами;

- в препаратах животных, которым выполнялось введение бисфосфонатов в послеоперационном периоде (группы 3 и 4), определяется минимальное значение активных остеобластов 1,2 в п/зр. (0,5 (0,0; 1,0)) и 1,3 в п/зр. (0,5 (0,0; 2,0)) соответственно, ($p < 0,05$), – что отражает более ранний переход к неактивным формам и может указывать на ускорение процессов остеорепарации;

- максимальная толщина костных балок (124,5 мкм), большее по сравнению с группами 2 и 3 общее количество остеобластов ($p < 0,05$) и остеоцитов (7,0 в п/зр. (6,5 (6,0; 7,75)) и 11,4 в п/зр. (10,5 (7,25; 13,8)), выявлены на фоне применения бисфосфонатов и при отсутствии противотуберкулезной терапии (группа 4), что подтверждает ожидаемый эффект применения бисфосфонатов.

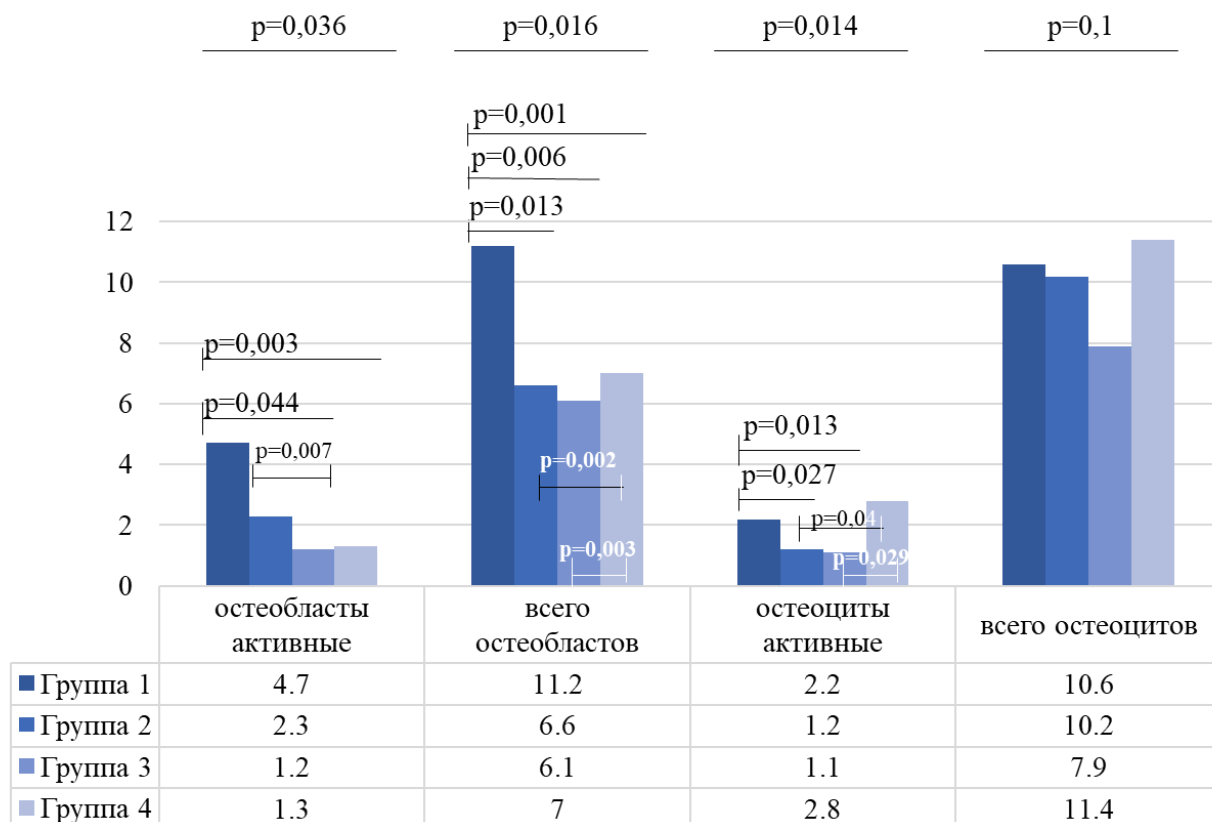


Рисунок 26 - Клеточность интактных препаратов левой бедренной кости (М на 1 п/з, ув. x1000)

3.6.3 Результаты исследования экспериментальных препаратов

Группа 1 (контроль заражения):

Выведение из эксперимента через 3 месяца

Доля активных остеобластов от клеток эндостальной зоны составляет 0,6, доля активных остеоцитов от общего количества остеоцитов составляет 0,2. Общая площадь, занимаемая костными балками в эпифизарной области, по данным морфометрического исследования, равна 28,0% (28,0; 28,0). Средняя толщина костных балок 251,0 (251,0; 251,0) мкм.

Кролик №3

Гистоархитектоника эпифизарной зоны нарушена из-за ярко выраженного активного специфического воспаления с эпителиоидно-макрофагальной инфильтрацией, формированием гранулем, которое распространяется на зоны

метаэпифиза и диафиза. Специфическое воспаление занимает не менее 45% площади среза кости, вовлекает в процесс суставную поверхность.

Метаэпифизарная пластинка не визуализируется в связи с выраженным воспалением.

Среди инфильтратов обширные зоны некроза с детритом, окруженные эпителиоидно-макрофагальным валом. Неравномерно по краю очагов происходит формирование незрелой соединительнотканной капсулы, местами плотной фиброзной капсулы, представленной фибробластами с крупными ядрами и пучками коллагеновых волокон (Рисунок 27А).

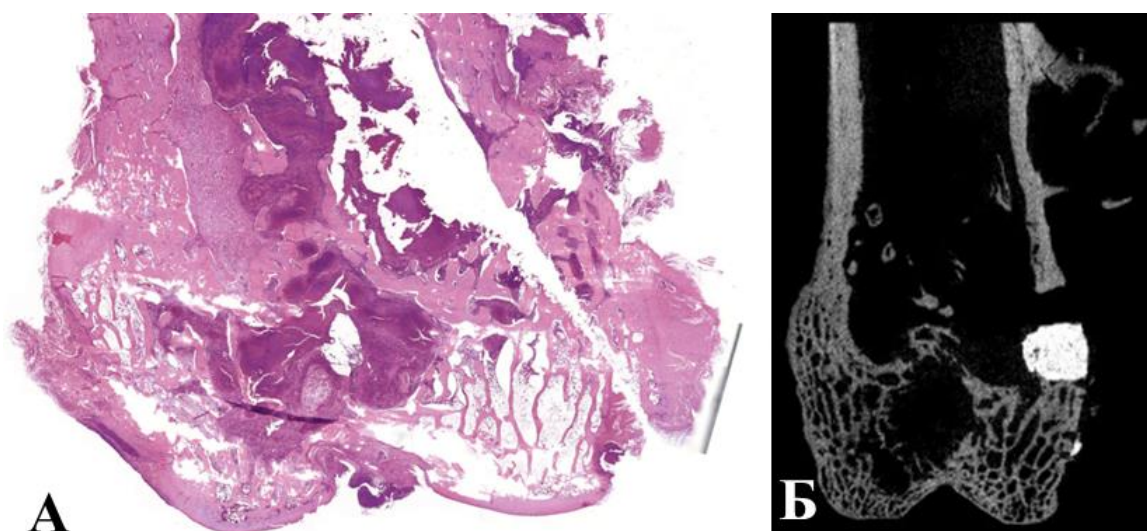


Рисунок 27 - Отсканированное изображение микропрепарата (А, окраска гематоксилином и эозином) и КТ-срез макропрепарата (Б) эпифиза правой бедренной кости (препарат №3 группы контроля заражения, аутопсия в контрольной точке 3 месяца)

По краю гранулем - лимфо-плазмоцитарная инфильтрация. Среди масс некроза множество секвестрированных костных балок (Рисунок 28 А, Б) и деформированных балок с активными остеобластами на поверхности. Окружающий костный мозг с явлениями атрофии и фиброзирования, увеличенным количеством сосудов и формированием зрелой грануляционной ткани.

Межбалочные пространства полностью замещены воспалительным инфильтратом и формирующимся фиброзом.

В окрашенных по Цилю - Нельсену срезах выявляются в большом количестве кислотоупорные формы бактерий, морфологически сходные с микобактериями туберкулеза (Рисунок 28 В, Г).

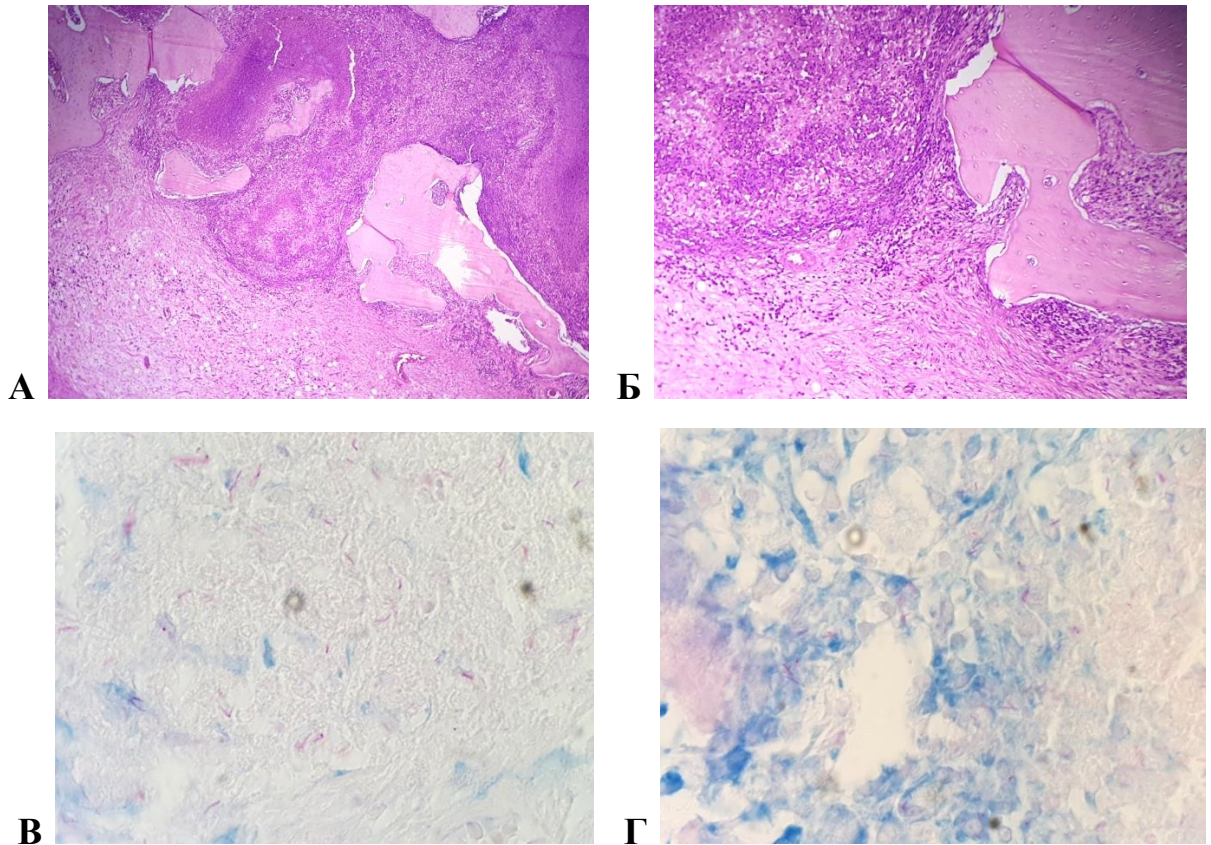


Рисунок 28 - Микрофотография очага воспаления в препарате группы контроля заражения: окраска гематоксилином и эозином (А, увеличение x100) - грануляционная ткань по периметру; окраска по Цилю - Нельсену (Б, увеличение x1000) - КУМ в очагах некроза

Выведение из эксперимента через 6 месяцев

Гистологическая картина в образцах значительно вариативна.

Доля активных остеобластов от клеток эндостальной зоны составляет 0,7, доля активных остеоцитов от общего количества остеоцитов - 0,2. Общая площадь,

занимаемая костными балками в эпифизарной области, по данным морфометрического исследования, равна 24,0 (21,0; 27,0) %. Средняя толщина костных балок составляет 139,0 (106,0; 172,0) мкм.

Кролик №20

Гистоархитектоника эпифиза нарушена за счет многочисленных разнокалиберных очагов специфического воспаления с казеозным некрозом в центре (Рисунок 29 А). Специфическое воспаление занимает 40,5% площади препарата, вовлекает в процесс зоны метаэпифиза и диафиза, суставную поверхность. Метаэпифизарная пластинка не визуализируется в связи с выраженным воспалением.

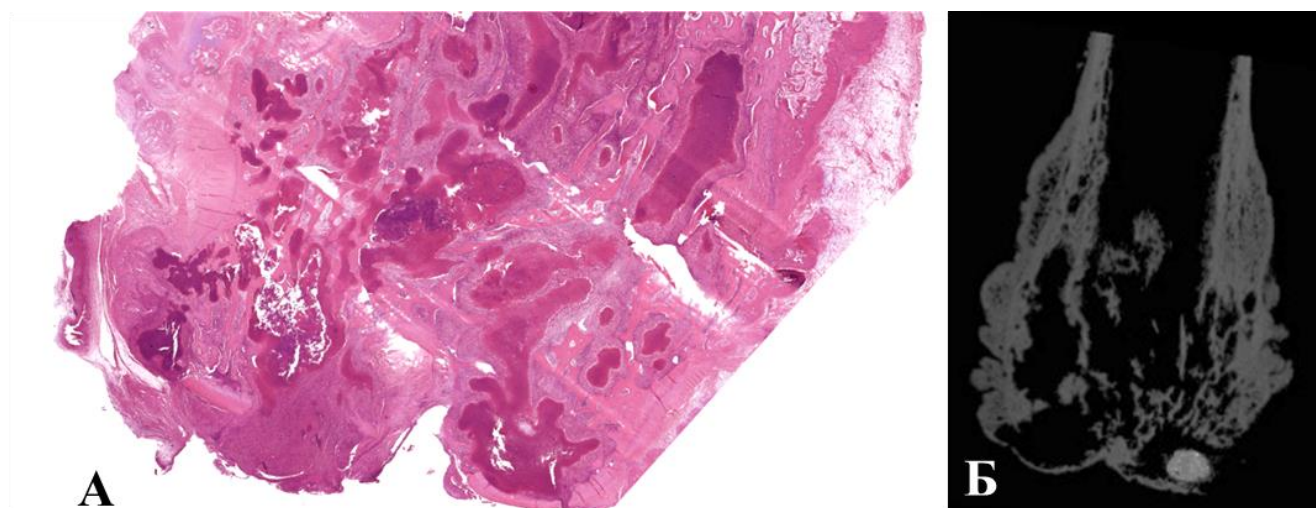


Рисунок 29 – Отсканированное изображение микропрепарата (А, окраска гематоксилином и эозином) и КТ-срез макропрепарата (Б) эпифиза правой бедренной кости (препарат №20 группы контроля заражения, аутопсия в контрольной точке 6 месяцев)

Некротические массы местами содержат детрит, ограничены неравномерной толщины слоем из эпителиоидных клеток, макрофагов, лимфоцитов (Рисунок 30). Отмечается наличие тонкой соединительной капсулы, которая представлена фибробластами с крупными ядрами и пучками коллагеновых

волокон. Часть балок в толще воспаления с явлениями лизиса, с неровной поверхностью, остеобласты на их поверхности почти не встречаются, присутствуют крупные секвестры, другая часть балок с активными остеобластами на поверхности. Окружающий костный мозг с явлениями атрофии и фиброзирования, увеличенным количеством сосудов и грануляционной тканью разной степени зрелости. Межбалочные пространства полностью замещены воспалительным инфильтратом и формирующимся фиброзом. Микобактерии выявляются в небольшом количестве.

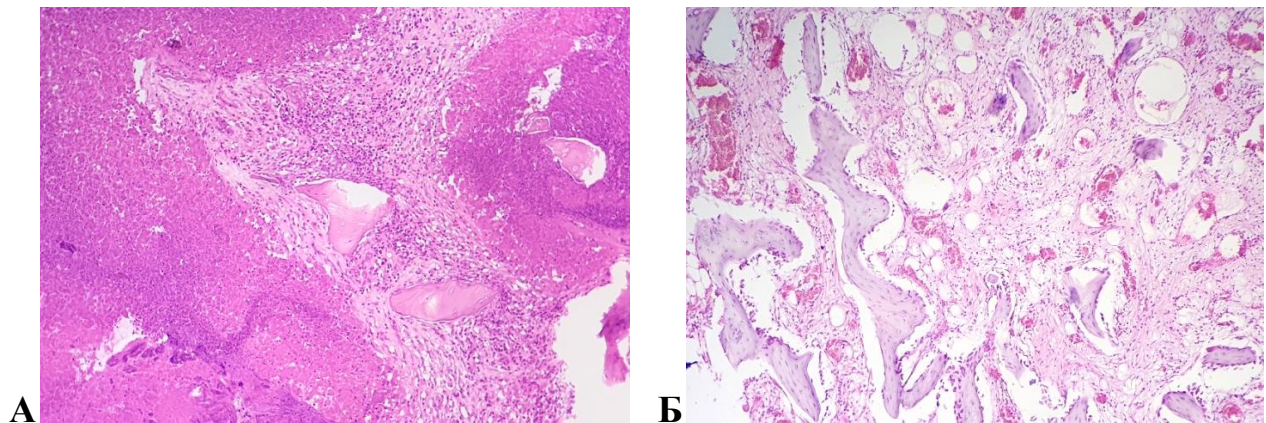


Рисунок 30 – Микрофотография очага воспаления с грануляционной тканью по периметру в препарате контрольной группы. Окраска гематоксилином и эозином (А - ув. x100, Б - ув. x200)

Кролик №17

Специфические воспалительные инфильтраты и гранулемы не обнаружены (Рисунок 31). Гистоархитектоника эпифизарной зоны сохранена. В зоне эпифиза визуализируется обедненный клетками костный мозг, количество сосудов умеренное, сосуды умеренно - полнокровны, отек не отмечается. Балки средней толщины распределены неравномерно. Балки преобладают по краям эпифиза, в центральной части их количество существенно ниже. В зоне центральной "ямки" эпифиза со стороны суставной поверхности за надкостницей отмечается участок воспаления, лимфо-плазмоцитарный инфильтрат, обрывки капсулы,

местами эпителиоидно-макрофагальной инфильтрат. Модель остита в этом образце не подтверждена (возможно, заражение и развитие специфического воспаления произошли в периостальных тканях).

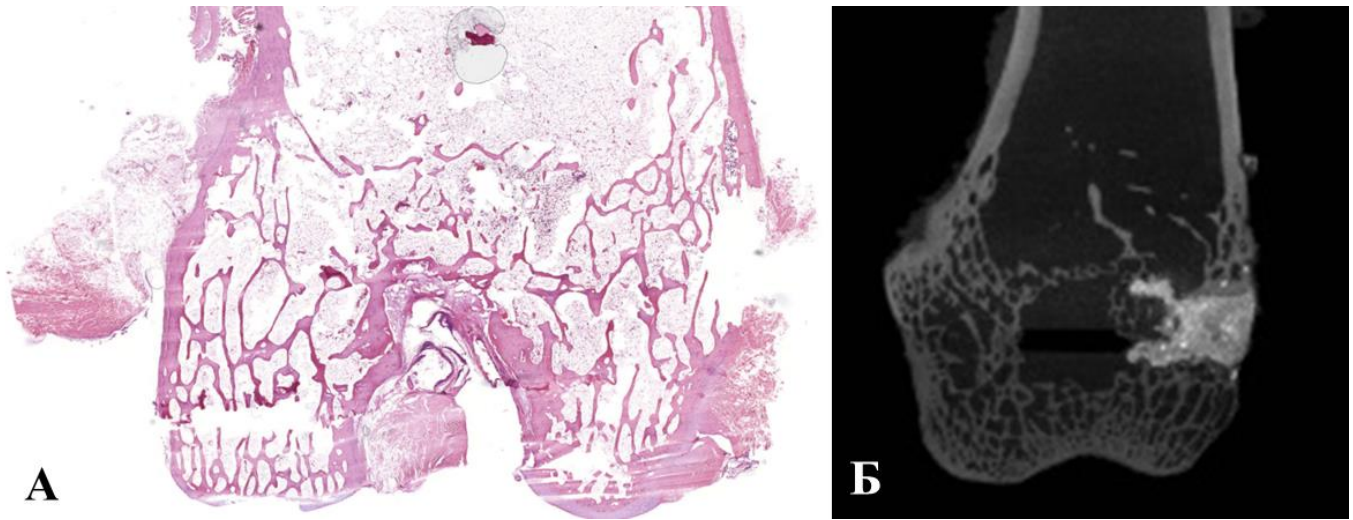


Рисунок 31 – Отсканированное изображение микропрепарата (А, окраска гематоксилином и эозином) и КТ-срез макропрепарата (Б) эпифиза правой бедренной кости (препарат №17 группы контроля заражения, аутопсия в контрольной точке 6 месяцев)

Особенности группы контроля заражения

В целом, по группе контроля заражения можно сделать вывод, что модель костного туберкулеза состоятельна. У 66,6% животных достигнуто развитие специфического воспаления в эпифизарной зоне бедренной кости с субтотальным поражением. У одного животного воспалительная инфильтрация выявлена не в кости, а в окружающих тканях над суставной поверхностью эпифиза.

Группа 2

Выведение из эксперимента через 3 месяца

Гистоархитектоника эпифизарной зоны нарушена в обоих препаратах. Изменения надкостницы не определяются.

В костной ткани доля активных остеобластов от клеток эндостальной зоны составляет 0,5, что почти в два раза выше значения в контрольной группе (0,3).

Доля активных остеоцитов от общего количества остеоцитов составляет 0,2 и не отличается от значения в контрольной группе. Общая площадь, занимаемая костными балками в эпифизарной области, по данным морфометрического исследования, равна 29,0 (26,0;32,0) %. Средняя толщина костных балок 144,5 (139,0; 150,0) мкм.

Кролик №8

Определяется ярко выраженное активное воспаление в толще эпифиза с некрозом в центральных участках, занимает 27,5% (10,0; 45,0) площади кости (Рисунок 32), КУМ (-). В зоне воспаления преобладает эпителиоидно-макрофагальная инфильтрация, менее выражен лимфо-плазмоцитарный компонент; в этой зоне также определяются костные секвестры (тут же встречаются остеокласты), многоядерные клетки, инородные элементы (шерсть). Вокруг развивается фиброз костного мозга, присутствуют полнокровные сосуды (Рисунок 33). Балки в зоне фиброза с активными остеобластами на поверхности (Рисунок 33 Г). Воспаление затрагивает метаэпифизарную пластинку, которая частично разрушена, но ближе к кортикальной кости представлена зрелыми балками. Процесс ремоделирования костной ткани в активной стадии.

Кролик №15

Участок специфического воспаления смещен в диафиз, содержит некроз с детритом в центре.

В эпифизе по данным КТ визуализируются мелкие фрагменты имплантата, на гистологических препаратах в этой зоне определяется специфическое воспаление с небольшими участками неспецифической лимфо-плазмоцитарной инфильтрации. При окрашивании по Цилю - Нельсену в небольшом количестве выявляются КУМ. Мелкие воспалительные инфильтраты местами окружены тонкой зрелой капсулой. В этой зоне активные растущие балки, в том числе маленькие балочки, также встречаются костные секвестры, полнокровные сосуды. С одной из сторон определяются отложения базофильных пластинчатых масс,

ближе к кортикальной кости и мелкодисперсных серо-коричневых масс рядом с инфильтратом и имплантатом.

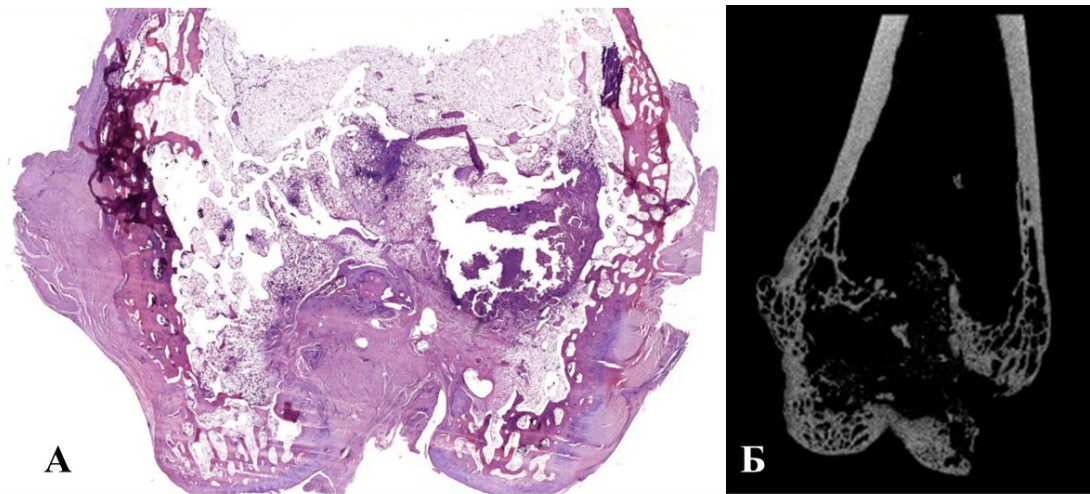


Рисунок 32 – Отсканированное изображение микропрепарата (А, окраска гематоксилином и эозином) и КТ-срез макропрепарата (Б) эпифиза правой бедренной кости (препарат №8 группы 2, аутопсия в контрольной точке 3 месяца)

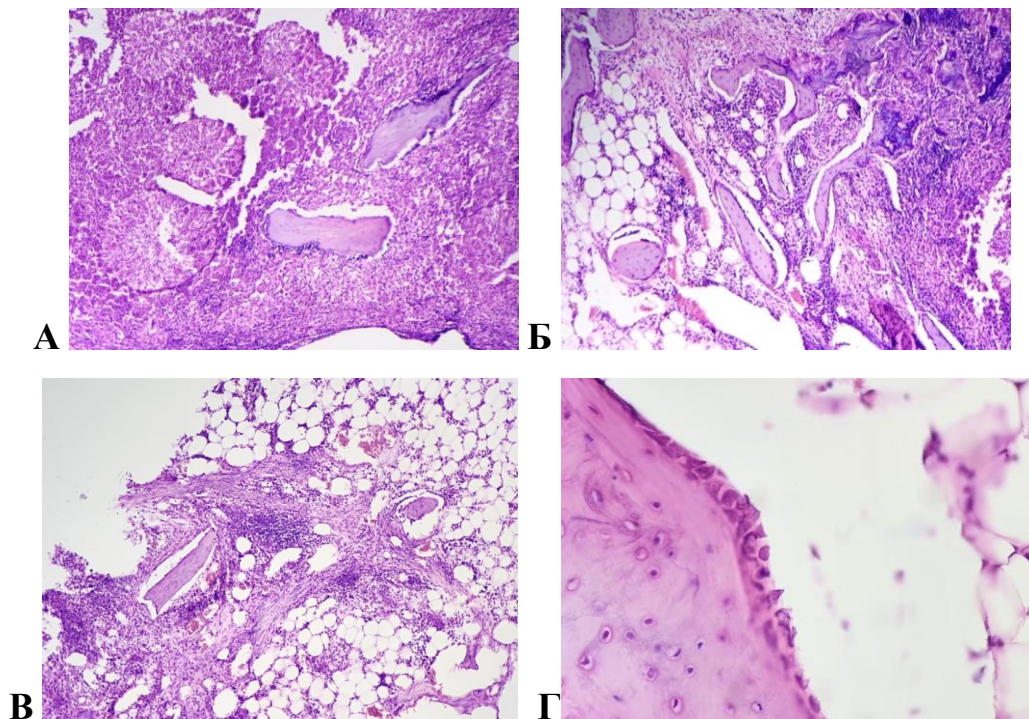


Рисунок 33 – Микрофотография очага воспаления с грануляционной тканью по периметру в препарате №8, окраска гематоксилином и эозином (А, Б - ув. x100). Грануляционная ткань с секвестрами и балками с активными остеобластами на поверхности в том же препарате (В – ув. x100, Г – ув. x400)

Выведение из эксперимента через 6 месяцев

Гистоархитектоника эпифизарной зоны приближена к нормальной структуре, балочность практически восстановлена. Балки распределены равномерно, представляют собой тонкопетлистую сеть. Сосудов умеренное количество, полнокровны. Активного ремоделирования костного мозга не отмечается. Грануляционная ткань и активная мезенхима практически не встречаются, что косвенно свидетельствует о завершении процессов ремоделирования. Однако увеличенное количество активных остеобластов на поверхности балок свидетельствует о текущем остеогенезе. Метаэпифизарная пластинка выражена слабо, прерывистая и представлена зрелыми балками (Рисунок 34).

Доля активных остеобластов от клеток эндостальной зоны составляет 0,4, что близко к значению в контрольной группе (0,3). Доля активных остеоцитов от общего количества остеоцитов составляет 0,2 и не отличается от значения в контрольной группе. Общая площадь, занимаемая костными балками в эпифизарной области, по данным морфометрического исследования, равна 27,5 (23,0; 32,0) %. Средняя толщина костных балок 114,8 (110,0; 119,5) мкм.

Кролик №2

По данным КТ визуализируются гранулы имплантата диафизе, на гистологических препаратах в этой зоне визуализируется неспецифическое воспаление, представленное в основном лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией с большим количеством многоядерных клеток (Рисунок 34 А, Рисунок 35 А). В этой же зоне обнаруживаются растущие балки с активными остеобластами на поверхности, полнокровные сосуды, единичные костные секвестры, вокруг очага определяется зрелая соединительнотканная капсула.

Кролик №4

Определяются специфические воспалительные инфильтраты на площади не более 1% от эпифизарной зоны. Выявлена одиночная продуктивная

эпителиоидноклеточная гранулема, окруженная валом из лимфоцитов, КУМ (-)
(Рисунок 34 В, Рисунок 35 Б).

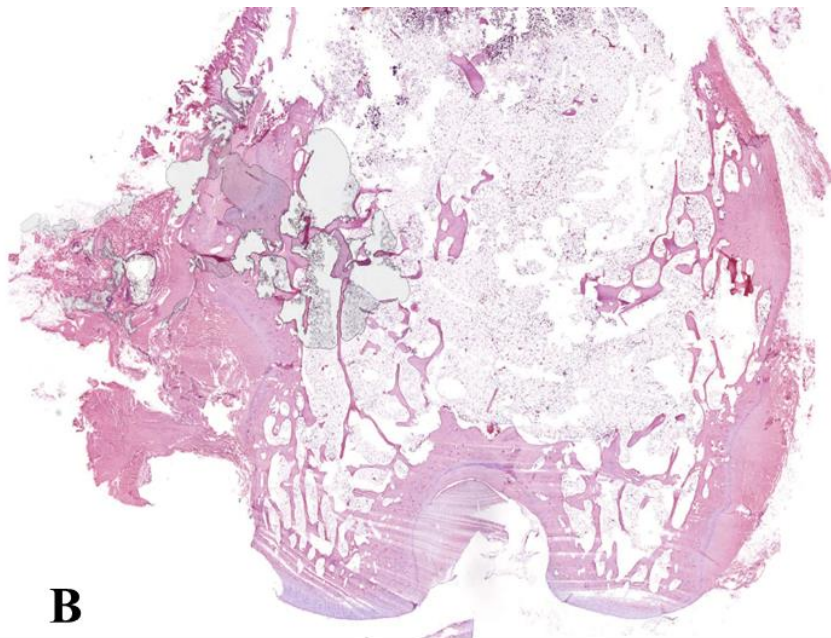
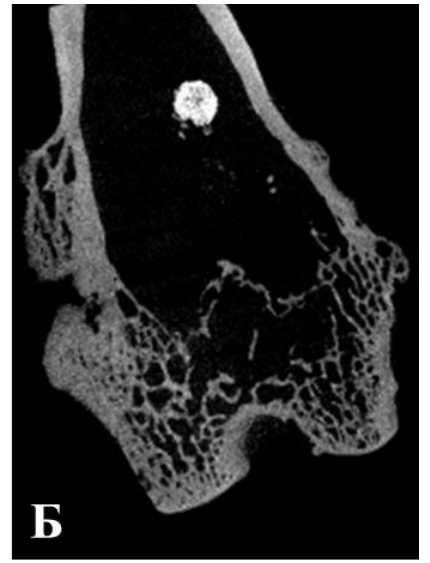
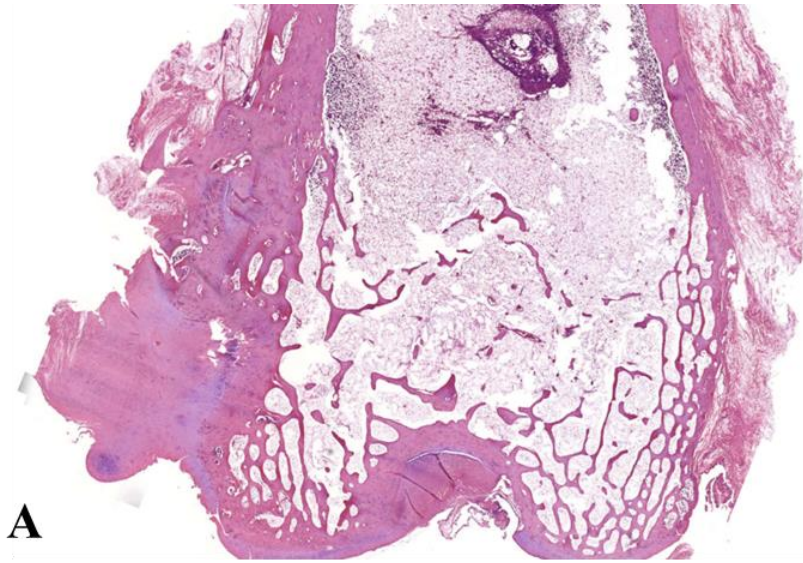


Рисунок 34 – Оцифрованные микропрепараты (А, В, окраска гематоксилином и эозином) и КТ-срезы аналогичных макропрепаратов (Б, Г) эпифиза правой бедренной кости (аутопсия в контрольной точке 6 месяцев)

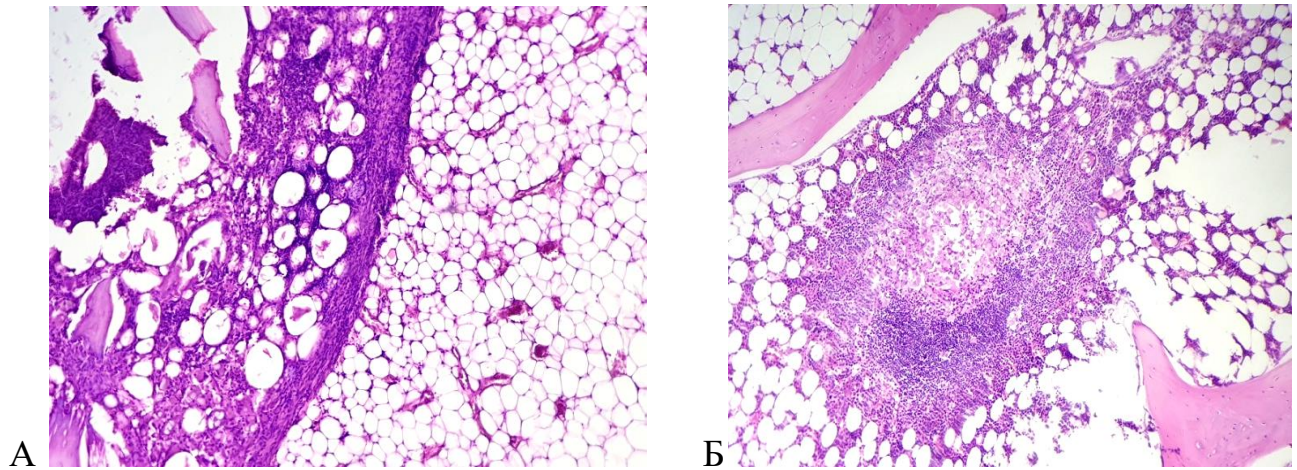


Рисунок 35 – Микрофотография очага неспецифического воспаления (А), окруженного соединительнотканной капсулой вокруг имплантата (окраска гематоксилином и эозином, препарат №2, ув. x100) и очага продуктивного воспаления (Б) без капсулы в толще эпифиза (окраска гематоксилином и эозином, препарат №4, ув. x100)

Группа 3

Выведение из эксперимента через 3 месяца

Гистоархитектоника эпифизарной зоны изменена из-за воспаления, балочность частично восстановлена. В эпифизе балки образуют толстопетлистую равномерную сеть.

Во всех образцах по данным КТ визуализируются гранулы имплантата в зоне метаэпифиза, на гистологических препаратах в этой зоне визуализируется неспецифическое воспаление, представленное в основном лимфоплазмочитарной инфильтрацией с большим количеством многоядерных клеток (Рисунок 36 А). В этой же зоне обнаруживаются растущие балки с активными остеобластами на поверхности, полнокровные сосуды, единичные костные секвестры, вокруг очагов определяется зрелая соединительнотканная капсула. Ремодуляция костного мозга вокруг очагов воспаления: активная мезенхима, разной зрелости грануляционная ткань с увеличенным количеством полнокровных сосудов.

Особенностью данной группы является обнаружение стромальных тяжей, представленных фибробласто-фиброцитоподобными клетками, коллагеновыми структурами, которые отходят лучами от зон остаточного воспаления, в этой зоне отмечается увеличенное количество полнокровных сосудов. В эпифизе балки образуют толстопетлистую равномерную сеть. Метаэпифизарная пластинка выражена слабо, прерывистая, либо не визуализируется из-за воспаления в данной области.

В гистологических препаратах в эпифизе определяются обширные (от 8% до 50%) очаги воспаления с некрозом в центральной части, однако преобладает неспецифическое воспаление на гранулы имплантата.

В костных балках доля активных остеобластов от клеток эндостальной зоны составляет 0,4 и близко к значению в контрольной группе (0,3). Доля активных остеоцитов от общего количества остеоцитов составляет 0,2 и не отличается от значения в контрольной группе. Общая площадь, занимаемая костными балками в эпифизарной области, по данным морфометрического исследования, равна 32,0% (21,0; 35,0). Средняя толщина костных балок 157,0 (133,0; 169,0) мкм.

Кролик №18

Достоверно определяется обширное специфическое воспаление (50% от площади препарата), в центре некроз с детритом, костные секвестры, рядом разной степени зрелости грануляционная ткань, увеличено количество полнокровных сосудов, формирующаяся капсула, воспалительная инфильтрация надкостницы, КУМ (-) (Рисунок 36 Б, Рисунок 37). В данной зоне балки с активными остеобластами на поверхности.

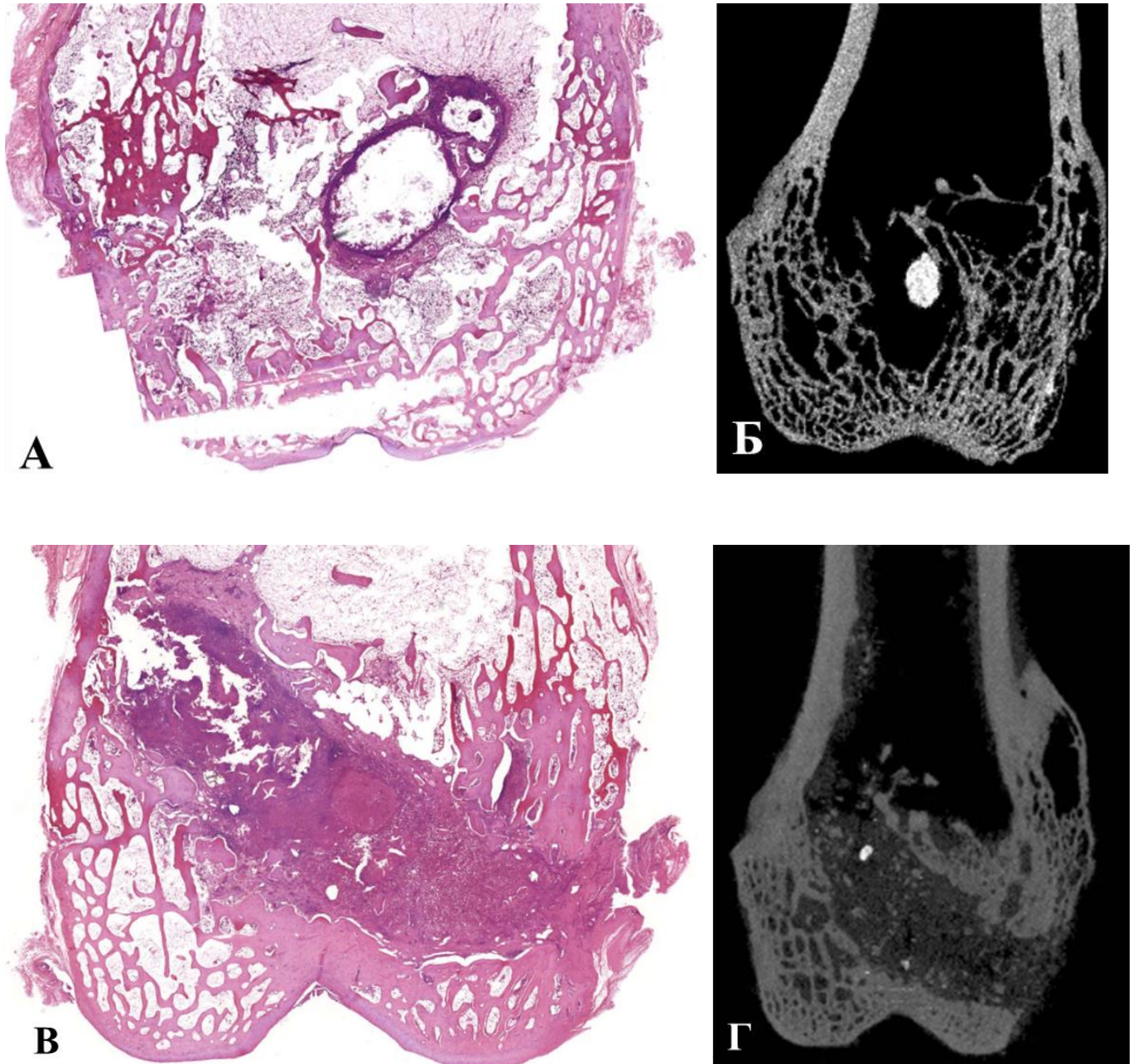


Рисунок 36 - Оцифрованные микропрепараты эпифиза правой бедренной кости (А - №10, В - №18) (окраска гематоксилином и эозином) и КТ-срезы аналогичных макропрепаратов (Б, Г) (аутопсия в контрольной точке 3 месяца)

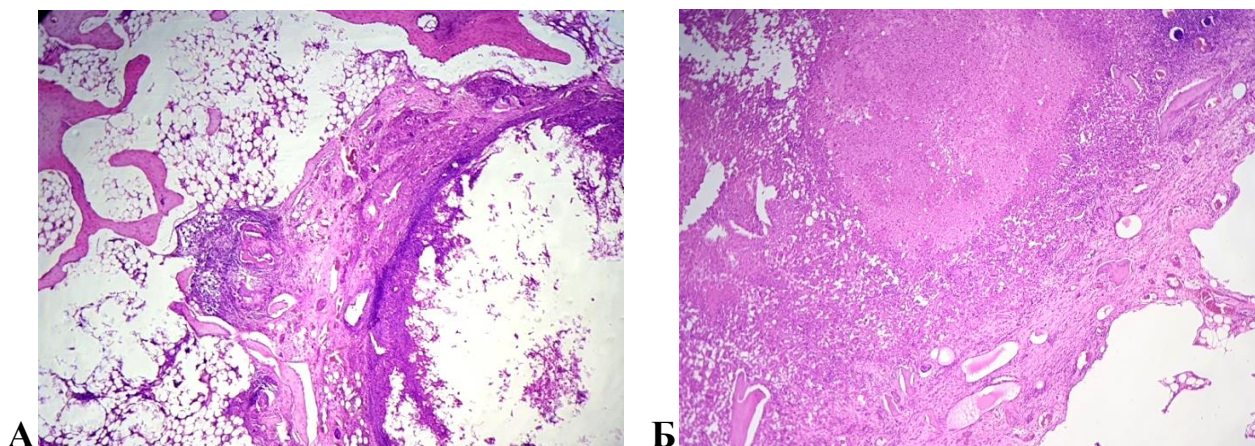


Рисунок 37 – Микрофотографии очага воспаления с некрозом в центре и соединительнотканной капсулой по периметру (препарат №18) (окраска гематоксилином и эозином; А - ув. x100 , Б – ув. x200)

Выведение из эксперимента через 6 месяцев

Гистоархитектоника эпифизарной зоны сохранена, балочность восстановлена (75%; №№5, 11, 14) В эпифизе балки образуют равномерную тонкопетлистую (25%; №11) либо толстопетлистую сеть (50%; №№5, 14) (Рисунок 38, Рисунок 39 В). Метаэпифизарная пластинка выражена слабо, прерывистая, либо не визуализируется из-за воспаления в данной области (25%; №6), ближе к кортикальной кости представлена зрелыми балками (№№5, 11, 14)

В данной группе большая вариабельность площади специфического воспаления, составляющего от 0 до 42% при медианном значении всего 3,5 (1,0; 23,5) %.

В 3 из 4 образцов (№№5, 6, 14) по данным КТ визуализируются гранулы имплантата в зоне эпифиза и метаэпифиза, на гистологических препаратах в этой зоне визуализируется неспецифическое воспаление, представленное в основном лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией. В этой же зоне обнаруживаются растущие балки с активными остеобластами на поверхности, полнокровные сосуды.

В 75% образцов (№№5, 11, 14) воспаление неспецифическое, остаточное, сохраняется в виде единичных мелких инфильтратов, занимают площадь не более

5% (Рисунок 39 А). Небольшие участки ремоделирования костного мозга - грануляционная ткань с увеличенным количеством полнокровных сосудов.

Особенностью данной группы является обнаружение стромальных тяжей (Рисунок 39 Б), представленных фибробласто-фиброцитоподобными клетками, коллагеновыми структурами, которые отходят лучами от зон остаточного воспаления; увеличенное количество полнокровных сосудов в этих зонах. На костных балках увеличено количество активных остеобластов.

Доля активных остеобластов от клеток эндостальной зоны составляет 0,5, что почти в двое выше, чем в контрольной группе (0,3). Доля активных остеоцитов от общего количества остеоцитов составляет 0,2 и не отличается от значения в контрольной группе. Общая площадь, занимаемая костными балками в эпифизарной области, по данным морфометрического исследования, равна 31,0% (13,0; 32,0), средняя толщина костных балок - 124,0 (116,0; 143,0) мкм.

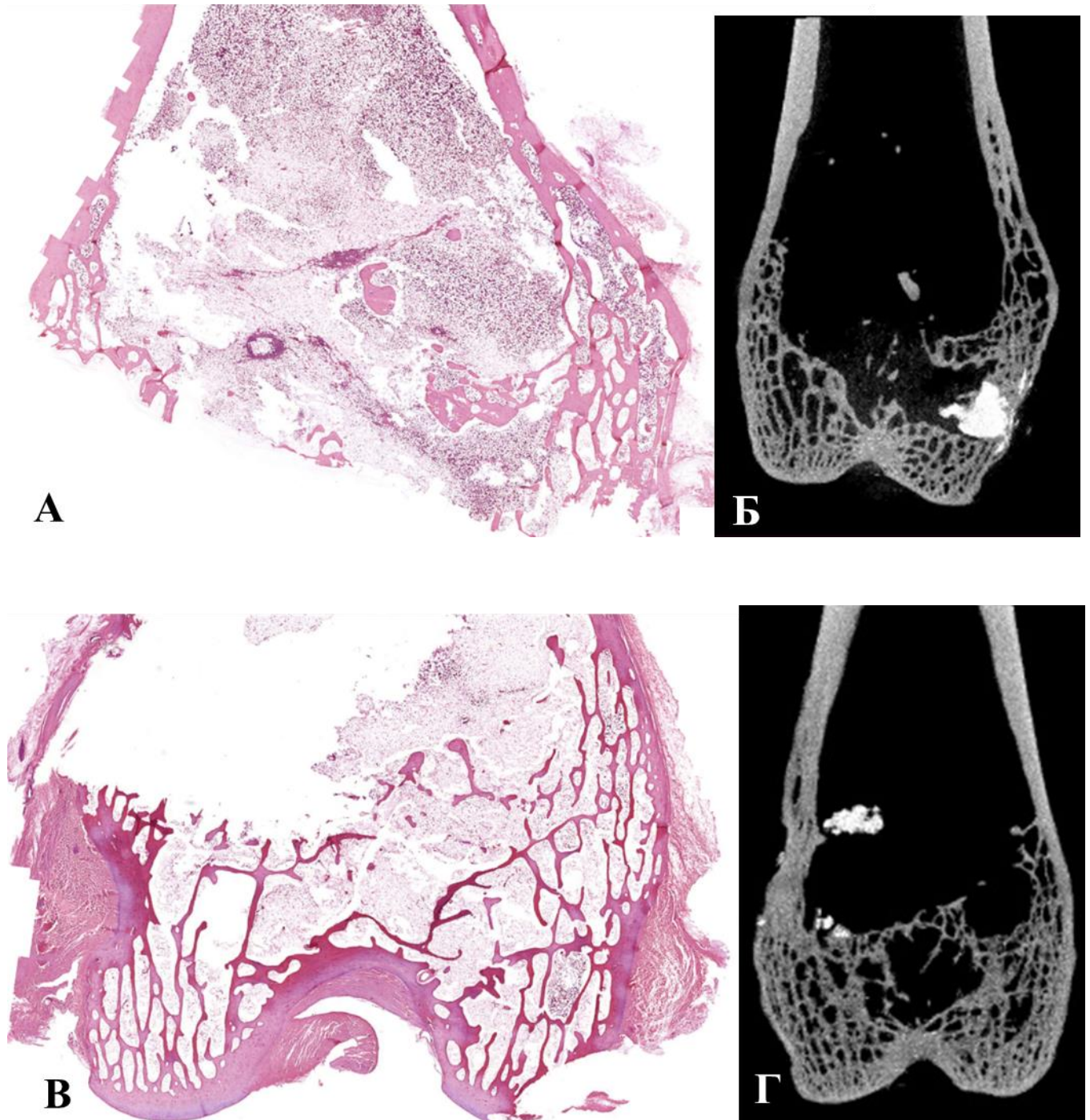


Рисунок 38 – Оцифрованные микропрепараты эпифиза правой бедренной кости (А - №14, В - №5) (окраска гематоксилином и эозином) и КТ-срезы аналогичных макропрепаратов (Б, Г) (аутопсия в контрольной точке 6 месяцев)

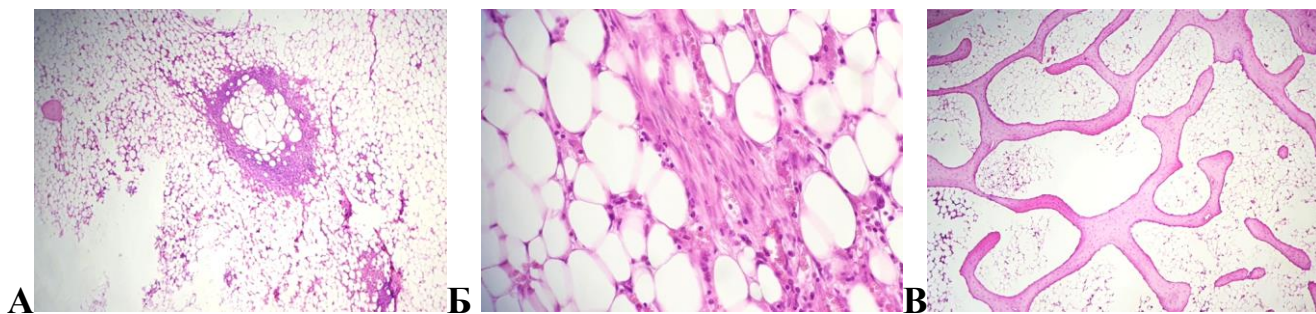


Рисунок 39 – Микрофотографии очага неспецифического воспаления препарата №14: А – ув. x100, стромальные тяжи (Б, ув. x200), костные балки в эпифизе препарата (В, ув. 100х) (А – В - окраска гематоксилином и эозином)

Кролик №6

Визуализируется обширный очаг специфического воспаления в эпифизе с переходом на диафиз, занимающий 42% от площади препарата (Рисунок 40). В центре - некроз с детритом, рядом разной степени зрелости грануляционная ткань, увеличено количество полнокровных сосудов, формирующаяся капсула (Рисунок 41). В этой зоне визуализируются костные секвестры и новые балки с активными остеобластами на поверхности. Воспаление определяется также в надкостнице и окружающих тканях. КУМ (+).

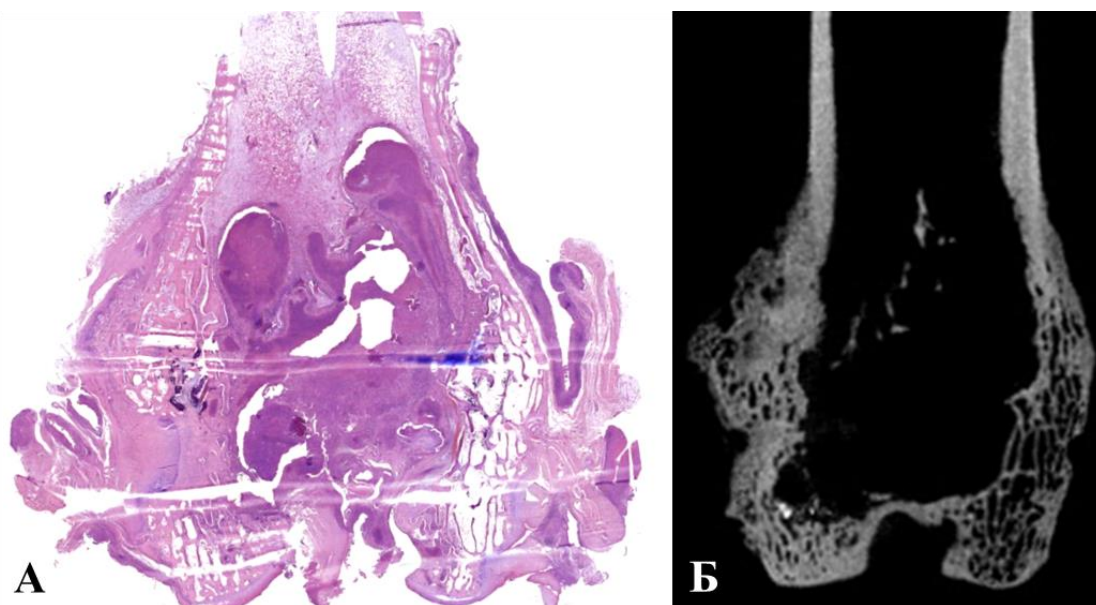


Рисунок 40 – Отсканированное изображение микропрепарата (А, окраска гематоксилином и эозином) и КТ-срез макропрепарата (Б) эпифиза правой бедренной кости (препарат №6 группы 3, аутопсия в контрольной точке 6 месяцев)

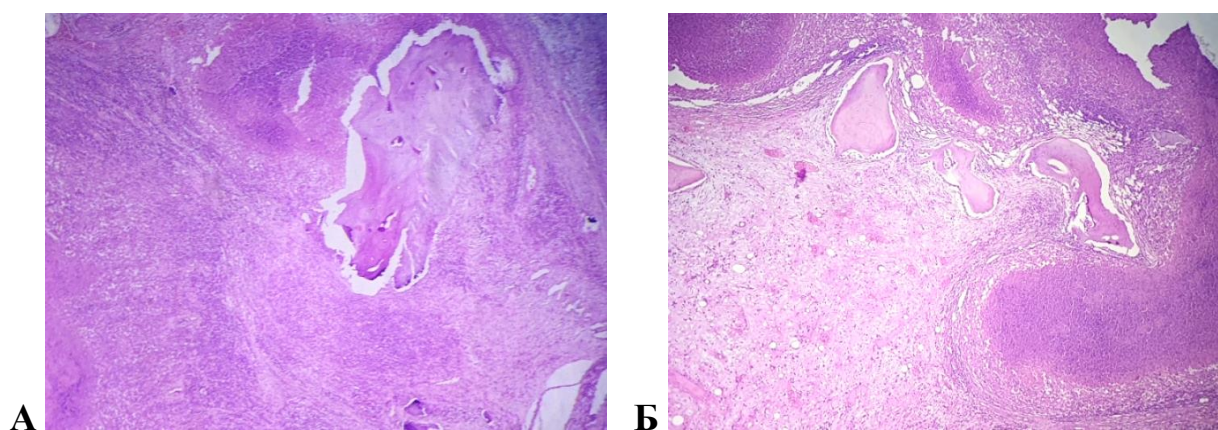


Рисунок 41 – Микрофотографии очага воспаления с грануляционной тканью вокруг препарата №6 (А - ув. x100, Б – ув. x200, окраска гематоксилином и эозином)

Группа 4

Выведение из эксперимента через 3 месяца

Гистоархитектоника эпифизарной зоны изменена из-за воспаления, балочность частично восстановлена, в эпифизе балки образуют петлистую сеть.

Метаэпифизарная пластинка слабо выражена, прерывистая, ближе к кортикальной кости представлена зрелыми балками.

Во всех образцах в зоне эпифиза ближе к суставной поверхности по данным КТ визуализируются гранулы имплантата, на гистологических препаратах в этой зоне визуализируется неспецифическое воспаление, представленное в основном лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией. В этой же зоне обнаруживаются растущие балки с активными остеобластами на поверхности, полнокровные сосуды, единичные костные секвестры, вокруг очагов местами определяется зрелая соединительнотканная капсула. Вокруг очагов воспаления ремодуляция костного мозга - активная мезенхима, разной зрелости грануляционная ткань с увеличенным количеством полнокровных сосудов.

Особенностью данной группы является обнаружение стромальных тяжей, представленных фибробласто-фиброцитоподобными клетками, коллагеновыми структурами, которые отходят лучами от зон воспаления, увеличенное количество полнокровных сосудов.

Доля активных остеобластов от клеток эндостальной зоны составляет 0,5, что почти в два раза выше, чем в контрольной группе (0,3). Доля активных остеоцитов от общего количества остеоцитов составляет 0,3, что чуть выше, чем в контрольной группе (0,2). Общая площадь, занимаемая костными балками в эпифизарной области, по данным морфометрического исследования, равна 35,0 (23,0;39,0) %. Средняя толщина костных балок 129,0 (121,0;179,0) мкм.

В группе отмечаются признаки активного остеогенеза по всем оцениваемым параметрам: доли активных остеобластов/остеоцитов, площадь костной ткани и активный стромальный и сосудистый компонент.

Кролик №13

Специфическое воспаление не обнаружено, в центральной части эпифиза мелкие неспецифические воспалительные инфильтраты - очаговые макрофагально-лимфоплазмоцитарные, капсула вокруг не визуализируется (Рисунок 42). Увеличено количество сформированных сосудов, которые полнокровны. В этой

зоне определяются балки с активными остеобластами на поверхности. Стромальные тяжи с макрофагально-лимфоцитарной инфильтрацией. Там же единичные секвестры, многоядерные клетки "инородных тел", диффузная единичная лимфоцитарная инфильтрация в толще ткани костного мозга. В эпифизе балки образуют петлистую сеть.

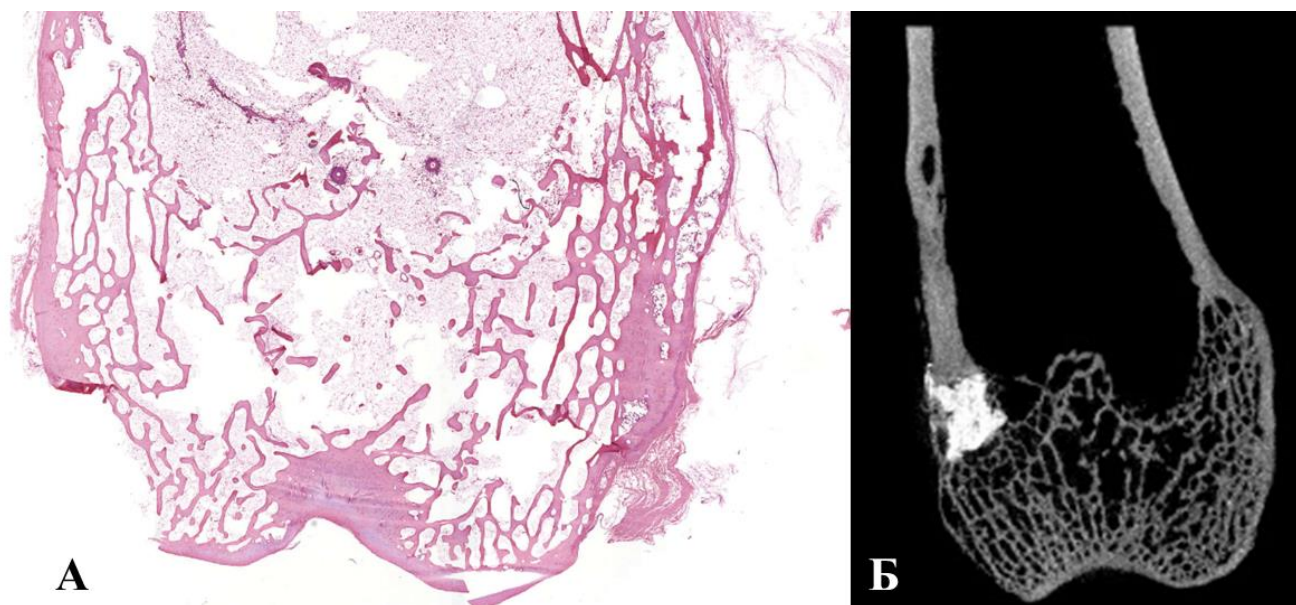


Рисунок 42 – Отсканированное изображение микропрепарата (А, окраска гематоксилином и эозином) и КТ-срез макропрепарата (Б) эпифиза правой бедренной кости (препарат №13 группы 4, аутопсия в контрольной точке 3 месяца)

Кролики №№16, 19

Визуализируются обширные очаги воспаления в эпифизе, занимающие от 28% до 48% площади, очаги представлены специфическим воспалением с высокой текущей активностью (4 степень активности) и неспецифическим на гранулы имплантата (Рисунок 43). В центральных участках определяется некроз с детритом, рядом разной степени зрелости грануляционная ткань, увеличено количество полнокровных сосудов, формирующаяся капсула. В этой зоне многочисленные костные секвестры. В зонах грануляционной ткани и большого количества сосудов много маленьких балок с активными остеобластами на поверхности. В диафизе

также очаги воспалительной лимфо-плазмоцитарной инфильтрации с незрелой грануляционной тканью и участками плотной стромы (стромальные тяжи), диффузная малоклеточная лимфоцитарная инфильтрация в толще ткани костного мозга. Воспаление визуализируется также в надкостнице и окружающих тканях.

КУМ в умеренном количестве визуализируются в некротизированных очагах. У одного животного КУМ обнаружены среди структур секвестрированных костных балок. Микобактерии формируют микроколонию, располагаются в трещинах костных балок и в запустевших лакунах остеоцитов (Рисунок 44).

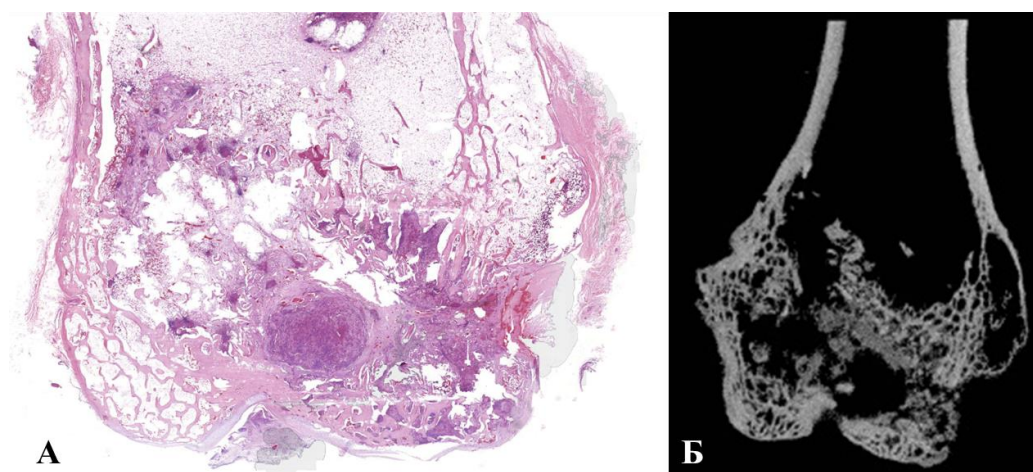


Рисунок 43 – Отсканированное изображение микропрепарата (А, окраска гематоксилином и эозином) и КТ-срез макропрепарата (Б) эпифиза правой бедренной кости (препарат №19 группы 4, аутопсия в контрольной точке 3 месяца)

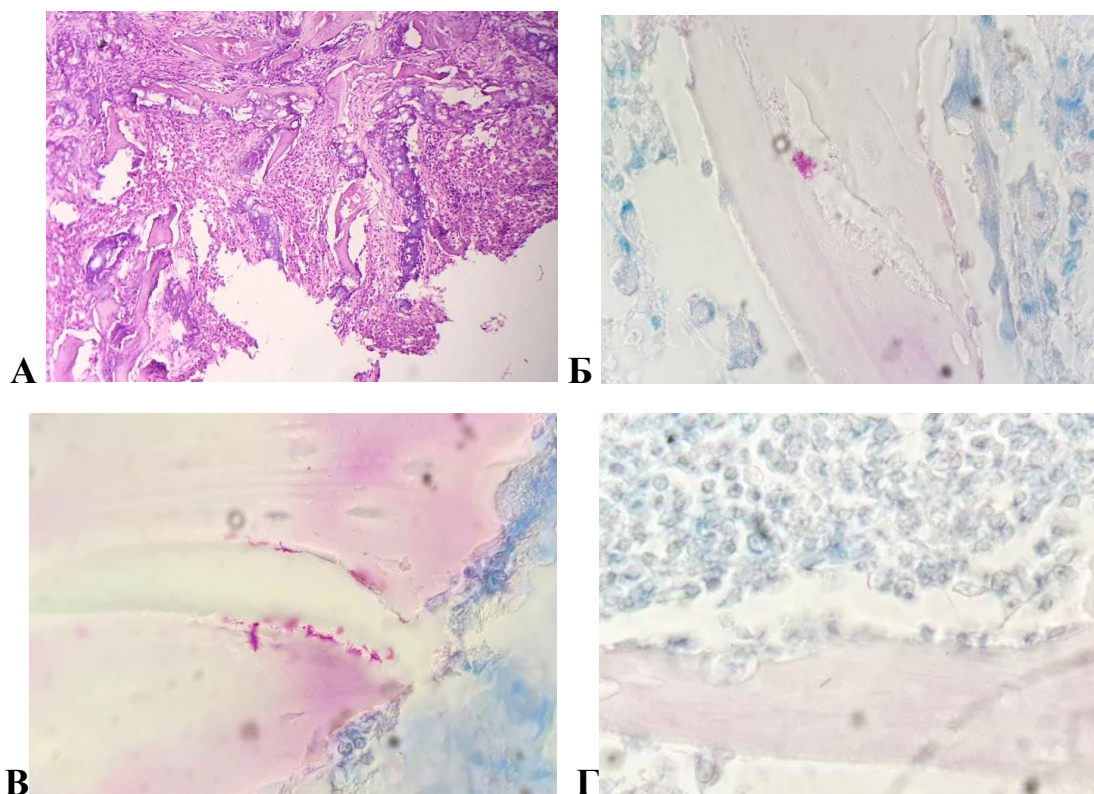


Рисунок 44 - Микрофотографии очага воспаления с секвестрами (А), окраска гематоксилином и эозином (ув. 100х); КУМ в трещинах костной балки (Б и В) и костных лакунах (Г), окраска по Цилю - Нельсену (ув.1000х.)

Выведение из эксперимента через 6 месяцев

Гистоархитектоника эпифизарной зоны изменена из-за воспаления, балочность частично восстановлена, в эпифизе балки образуют петлистую сеть. Метаэпифизарная пластинка слабовыраженная, прерывистая, ближе к кортикальной кости представлена зрелыми балками (Рисунок 45).

Во всех образцах в зоне эпифиза ближе к кортикальной кости по данным КТ визуализируются гранулы имплантата, на гистологических препаратах в этой зоне визуализируется неспецифическое воспаление, представленное в основном лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией. В этой же зоне обнаруживаются растущие балки с активными остеобластами на поверхности, полнокровные сосуды, единичные костные секвестры, вокруг очагов местами определяется зрелая соединительнотканная капсула. Вокруг очагов воспаления - ремодуляция костного

мозга: активная мезенхима, разной зрелости грануляционная ткань с увеличенным количеством полнокровных сосудов. От зоны воспаления отходят стромальные тяжи с лимфоцитарной инфильтрацией, встречаются единичные многоядерные клетки типа "инородных тел", диффузная единичная лимфоцитарная инфильтрация в толще ткани костного мозга.

Медианное значение % площади воспаления составило всего 8% (14,5; 13,5). Доля активных остеобластов от клеток эндостальной зоны составляет 0,5 (0,2; 0,6), что почти в два раза выше, чем в контрольной группе (0,3). Доля активных остеоцитов от общего количества остеоцитов составляет 0,2 (0,1; 0,3) и не отличается от значения в контрольной группе. Общая площадь, занимаемая костными балками в эпифизарной области, по данным морфометрического исследования, равна 33,0% (28,5; 34,0), средняя толщина костных балок - 148,5 (134,5; 156,0) мкм.

Кролик №12

В эпифизе визуализируется очаг специфического воспаления (площадью 17%), в центре некротизированные массы, окруженные разной степени зрелости грануляционной тканью, увеличено количество полнокровных сосудов, окружающая капсула разной степени зрелости с признаками текущей активности процесса (Рисунок 46, Рисунок 47). В этой зоне многочисленные костные секвестры и балки с активными остеобластами на поверхности. В диафизе очаги лимфо-плазмоцитарной воспалительной инфильтрации с незрелой грануляционной тканью и участками плотной стромы - стромальные тяжи, диффузная рассеянная малоклеточная лимфоцитарная инфильтрация в толще ткани костного мозга. В зонах грануляционной ткани и большого количества сосудов, много вновь образованных балочек с активными остеобластами на поверхности. В эпифизе балки образуют петлистую сеть.

Особенностью данной группы является обнаружение стромальных тяжей, представленных фибробласто-фиброцитоподобными клетками, коллагеновыми

структурами, обнаружение многоядерных клеток инородных тел, увеличенное количество полнокровных сосудов.

В группе отмечаются признаки активного остеогенеза по всем оцениваемым параметрам: доли активных остеобластов/остеоцитов, площадь костной ткани и активный стромальный и сосудистый компонент.

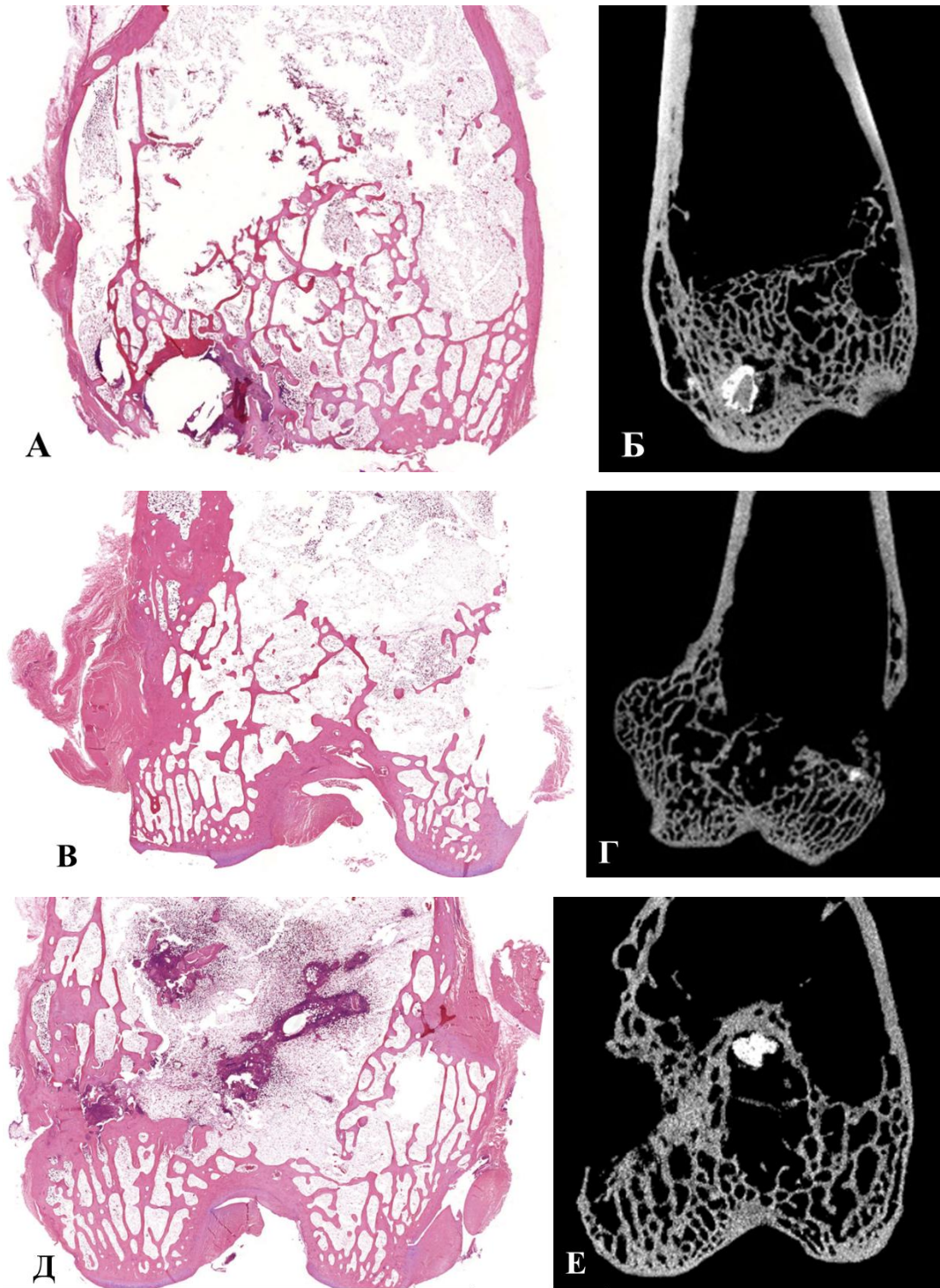


Рисунок 45 – Оцифрованные микропрепараты (А - №1, В - №9, Д - №7; окраска гематоксилином и эозином) и КТ-срезы аналогичных макропрепаратов (Б, Г, Е) эпифиза правой бедренной кости (аутопсия в контрольной точке 6 месяцев)

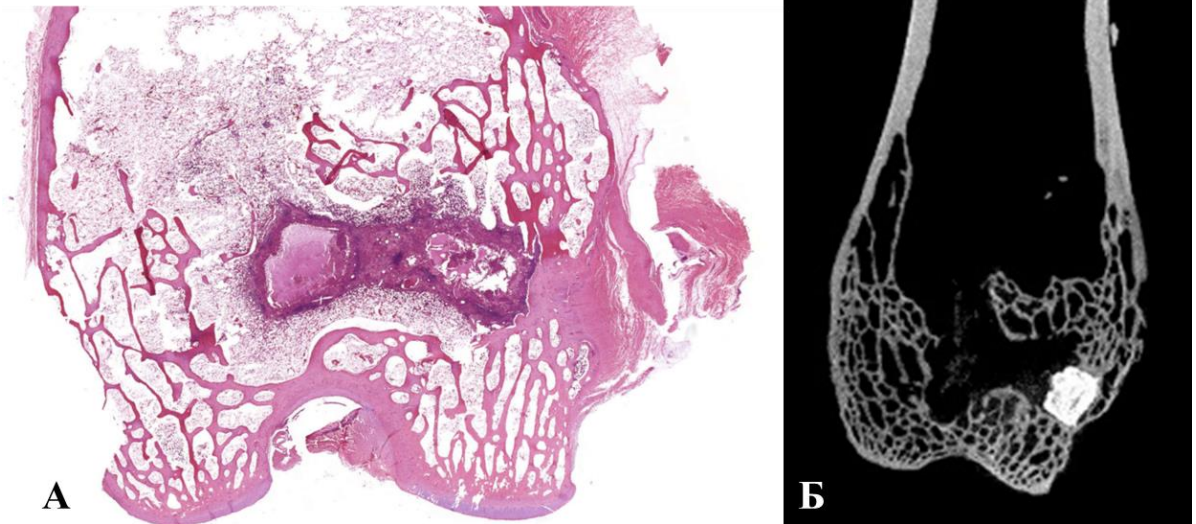


Рисунок 46 – Отсканированное изображение микропрепарата (А, окраска гематоксилином и эозином) и КТ-срез макропрепарата (Б) эпифиза правой бедренной кости (препарат №12 группы 4, аутопсия в контрольной точке 6 месяцев)

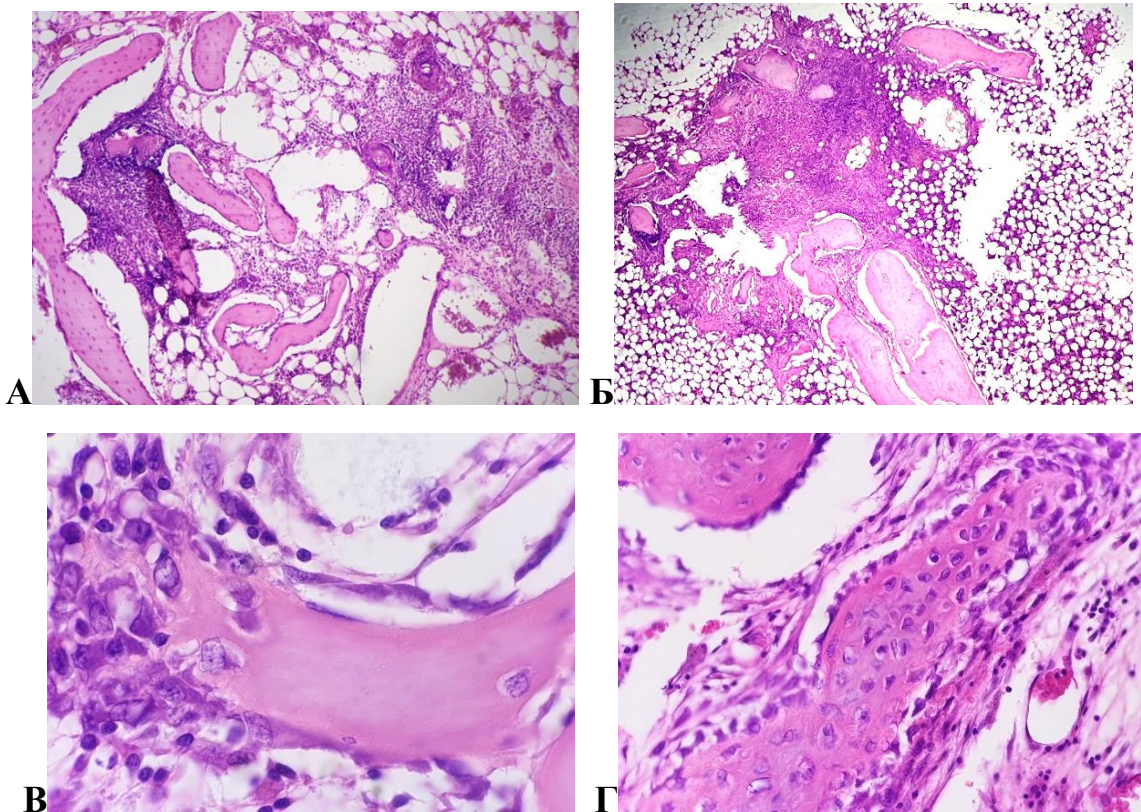


Рисунок 47 – Микрофотографии очага воспаления с балками с активными остеобластами, препарат №12 (окраска гематоксилином и эозином, А, Б - ув. x 100, В, Г - ув. x1000)

Животные в группах 2 - 4 с «выбывающимися» данными морфометрии не были исключены из групп и учитывались при статистической обработке результатов. В расчет статистических параметров не вошел образец №17 группы контроля заражения, не имевший признаков туберкулезного процесса кости.

3.6.4 Межгрупповой анализ

Интактные левые бедренные кости

Выявлены отличия в толщине костных балок и остеомоделирующих клеточных популяциях в интактных образцах из разных групп:

– в группе 1 определяется минимальные площадь костной ткани и толщина костных балок, в остальных группах зависимости между данными показателями нет;

– в группе 4 - максимальная толщина костных балок и большее общее количество остеобластов и остеоцитов (Рисунок 48, Рисунок 49);

– пул остеоцитов в группах 2 и 3 представлен преимущественно неактивными клетками, что косвенно указывает на регулирование процессом остеогенеза ПТТ (Рисунок 49);

– максимальное количество остеобластов, в том числе активных (42%), наблюдается в группе контроля заражения (группа 1), что может указывать на потенцированную системную активацию остеомодуляции во всех костях скелета на фоне специфического инфекционного процесса (Рисунок 50).

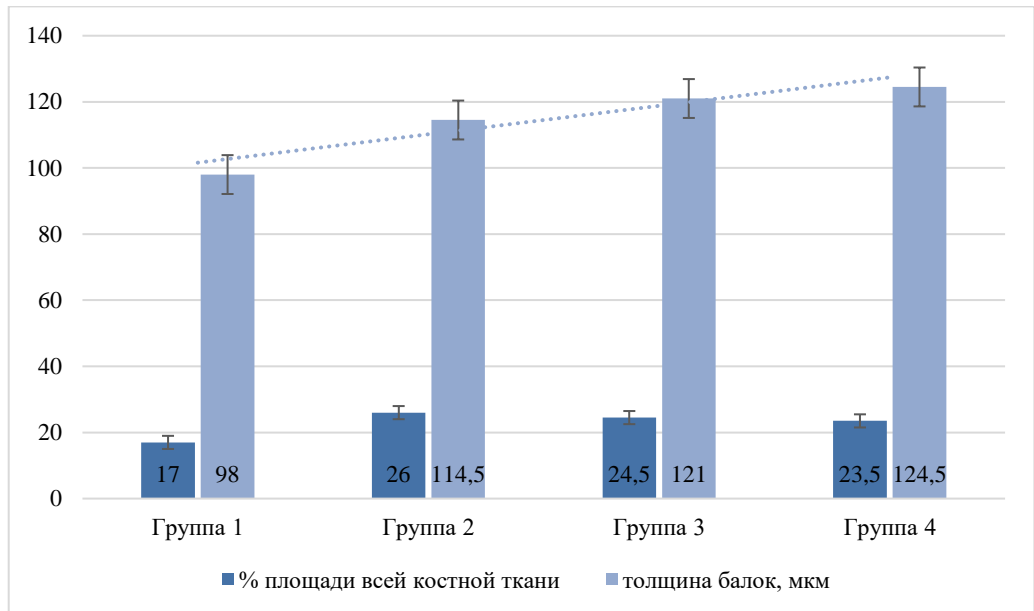


Рисунок 48 - Площадь костного матрикса и толщина костных балок в эпифизе интактных (левых) бедренных костей, 3 месяца наблюдения

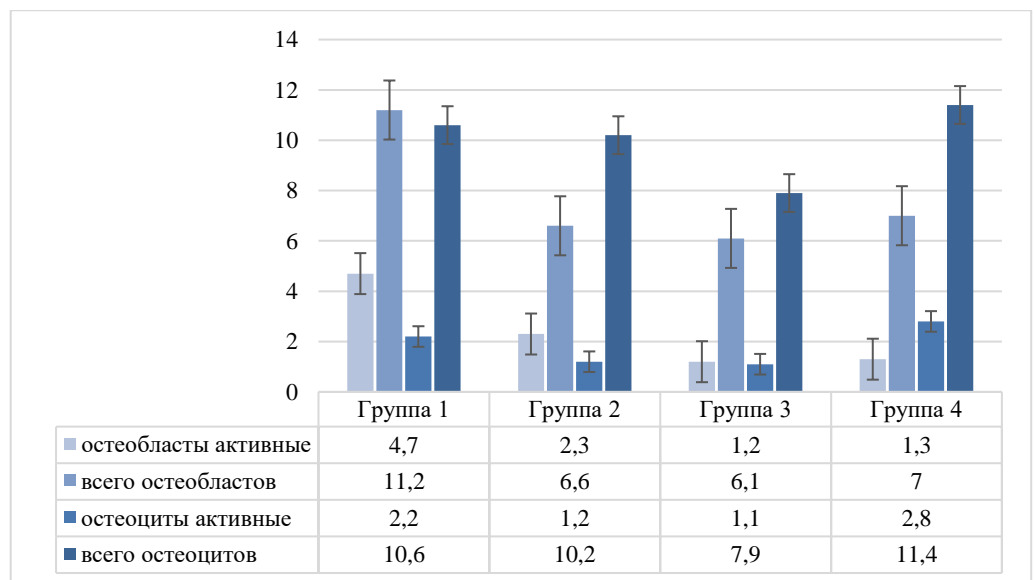


Рисунок 49 - Остеомоделирующие клеточные популяции эпифиза интактных (левых) бедренных костей в контрольной точке 3 месяца (количество клеток на 1 поле зрения, ув. x1000), Ме

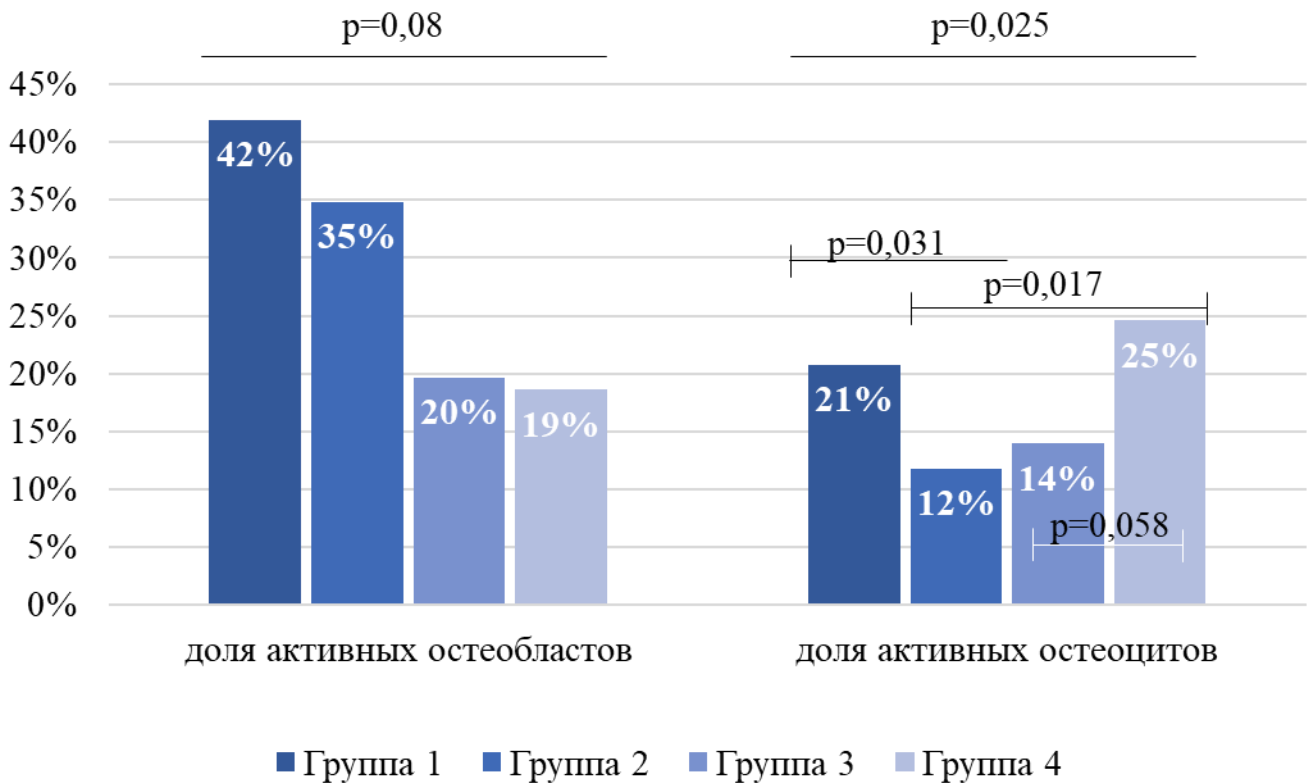


Рисунок 50 - Активные клеточные популяции эпифиза интактных (левых) бедренных костей (% от общего числа остеобластов/остеоцитов), 3 месяца наблюдения

Остеокласты

Остеокласты не определяются в интактных контралатеральных бедренных костях и в препаратах, в которых отсутствуют специфические или неспецифические воспалительные инфильтраты. Число остеокластов составляет от 0 до 3 клеток в поле зрения при увеличении $\times 1000$, в зоне воспаления сумма по 10 полям зрения для одного препарата больше аналогичного значения на отдалении. Корреляции между наличием специфического или неспецифического воспаления и количеством остеокластов отсутствуют.

Особенностями групп 2 - 4 являются:

группа 2 - нарастание количества остеокластов в динамике,

группа 3 - снижение количества остеокластов до 0 во всех полях зрения на сроке наблюдения 6 месяцев (Рисунок 51);

группа 4 - самое низкое число остеокластов среди экспериментальных групп, не меняющееся в динамике.

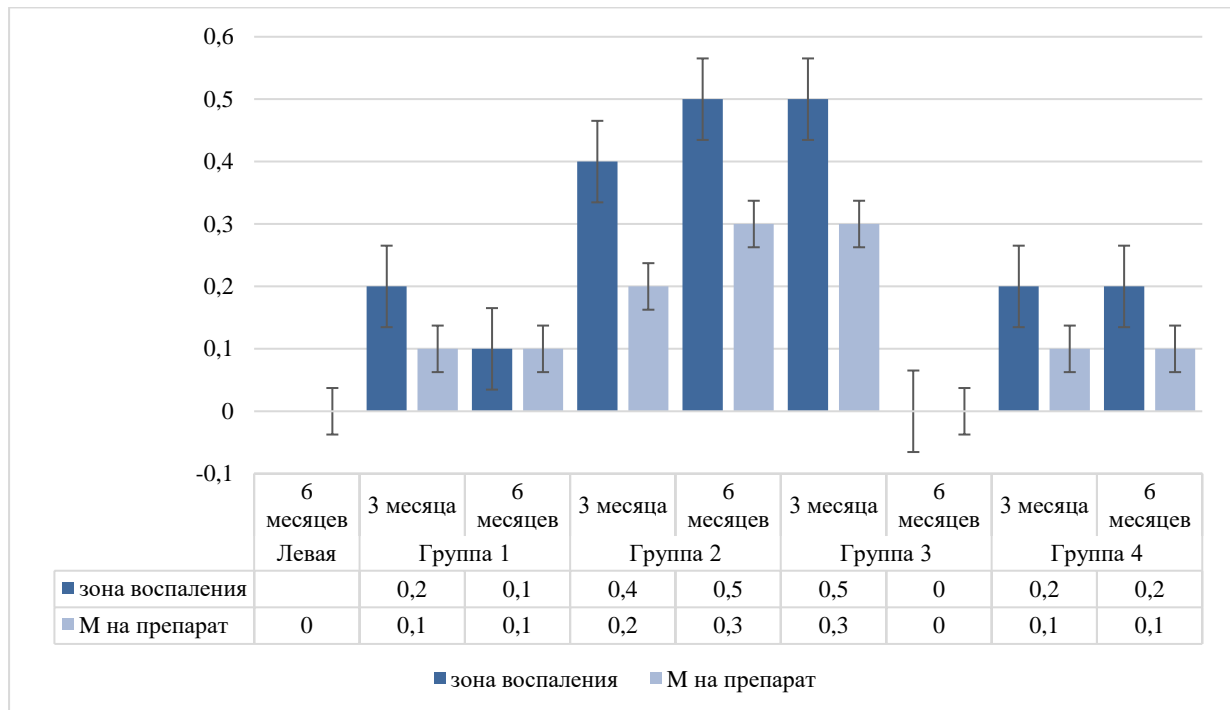


Рисунок 51 - Количество остеокластов на одно поле зрения в эпифизах бедренных костей (ув. x1000), Ме

3 месяца наблюдения

Специфическое воспаление

Текущий специфический воспалительный процесс отмечается в группе контроля заражения в 100% случаев, занимает максимальную площадь от площади препарата (45%), в группах 2 - 4 в 33,3 - 50% препаратов, без статистически значимых различий.

В очагах специфического воспаления преобладают фазы инфильтрации и отграничения, максимально выражен процесс отграничения в группе 4. Некроз

занимает от 8,9 до 25% площади воспаления с максимальным значением в группе 3 (Рисунок 52).

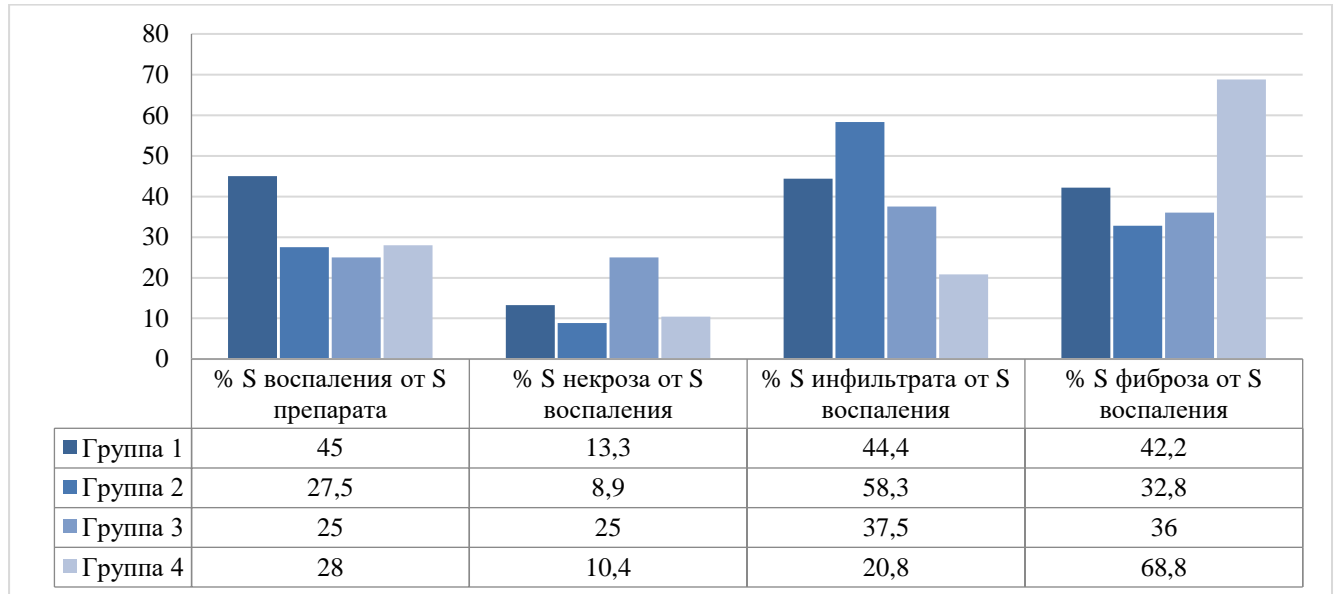


Рисунок 52 - Характер и распространенность специфического воспаления в эпифизах бедренных костей, аутопсированных в контрольной точке 3 месяца, Ме, (S – площадь)

Неспецифическое воспаление

В препаратах групп №№3 и 4, не имеющих очагов специфического воспаления, площадь неспецифической инфильтрации составила от 1 до 25%, наличие неспецифического воспаления связано с наличием гранул имплантата.

Площадь костного матрикса и толщина костных балок

Отсутствуют статистически достоверные различия площади костной ткани эпифиза между группами (Рисунок 53).

Максимальная толщина костных балок на данном сроке наблюдения определяется в группе 1 ($p < 0,001$), что можно объяснить отсутствием хирургического лечения и, соответственно, кюретажа костной ткани. Среди групп 2 - 4 максимальные значения толщины костных балок определяются в группе 3 ($p < 0,001$) (Рисунок 54).

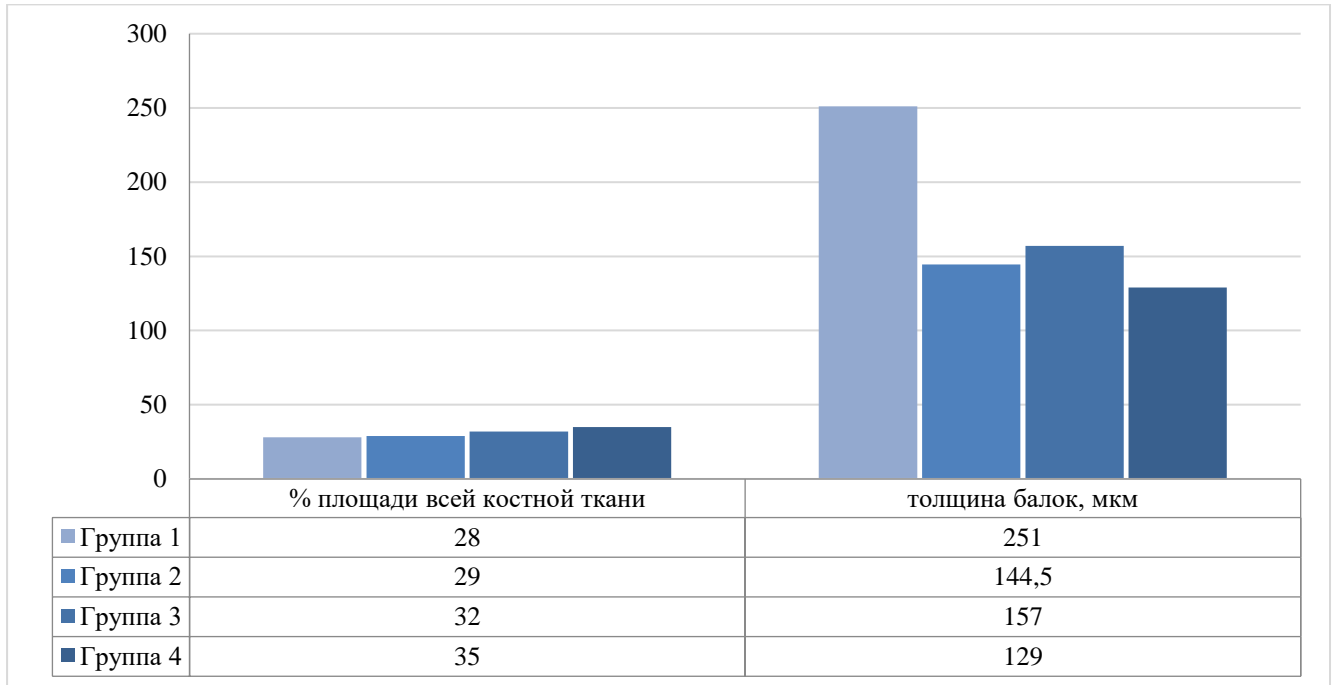


Рисунок 53 - Площадь костной ткани и толщина балок в эпифизарной зоне в контрольной точке 3 месяца, Ме

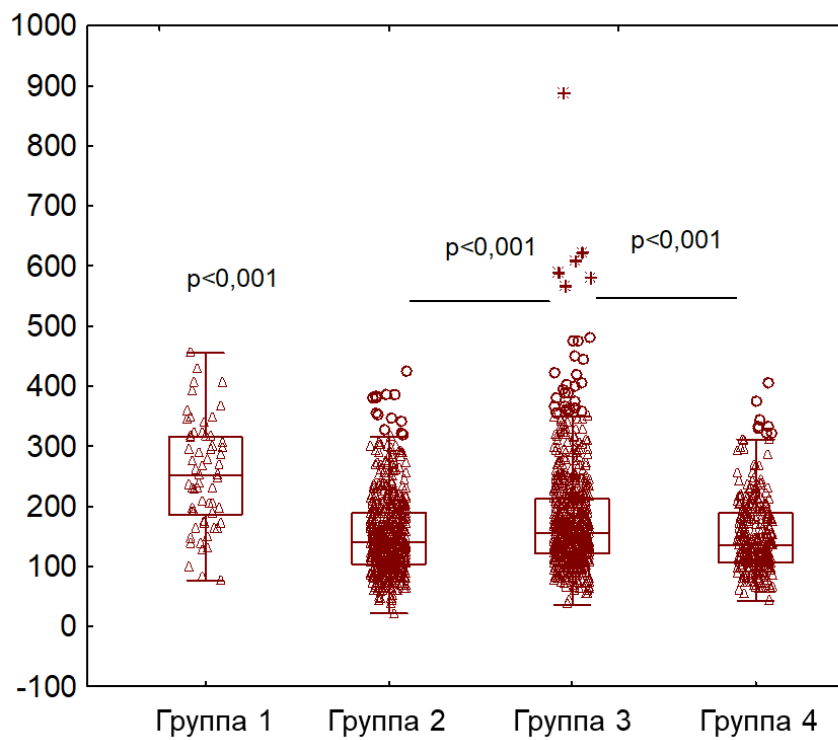


Рисунок 54 - Толщина костных балок в эпифизе в контрольной точке 3 месяца, мкм

Клеточный состав

Определяется различное количество остеобразующих клеток в зависимости от локализации зон счета: в зоне воспаления остеобластов и остеоцитов значительно больше по сравнению с участками вне зон воспаления (на отдалении) в пределах эпифиза (Рисунок 55, Рисунок 56). При этом различия в среднем количестве остеобластов между группами не выявлены. Наибольшее число остеоцитов определяется в препаратах группы 1 (15,7 в п/з).

Наиболее выраженная остеобразующая активность на данном сроке наблюдения отмечается в группах 1 (за счет увеличения доли активных остеобластов в зоне воспаления) (Рисунок 57) и 4 (за счет увеличения доли активных остеоцитов) (Рисунок 58).

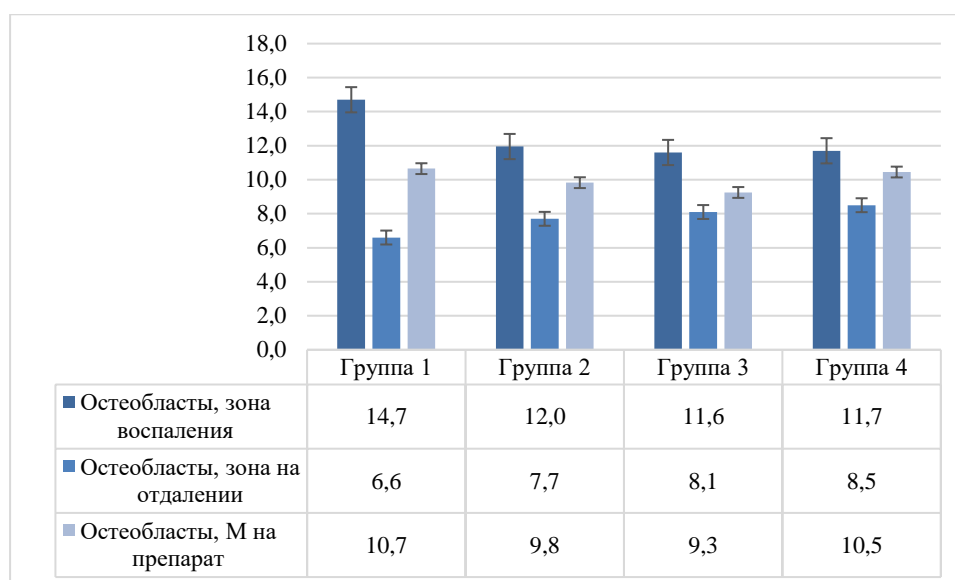


Рисунок 55 - Количество остеобластов в эпифизе на 1 поле зрения в контрольной точке 3 месяца (ув. x1000), Ме

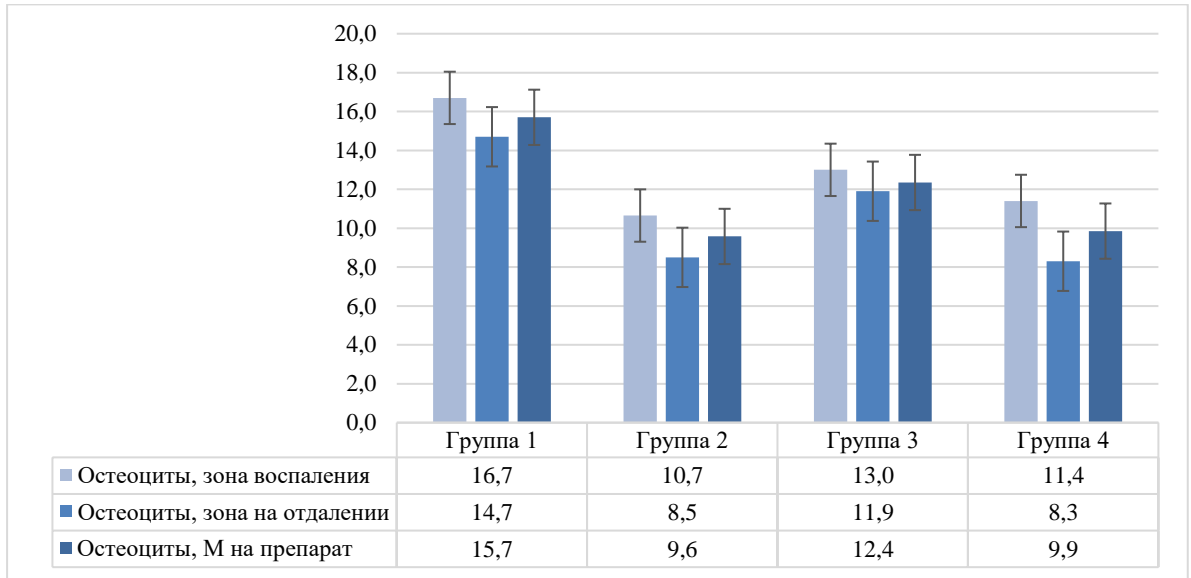


Рисунок 56 - Количество остеоцитов на поле зрения в контрольной точке 3 месяца (ув. x1000), Ме

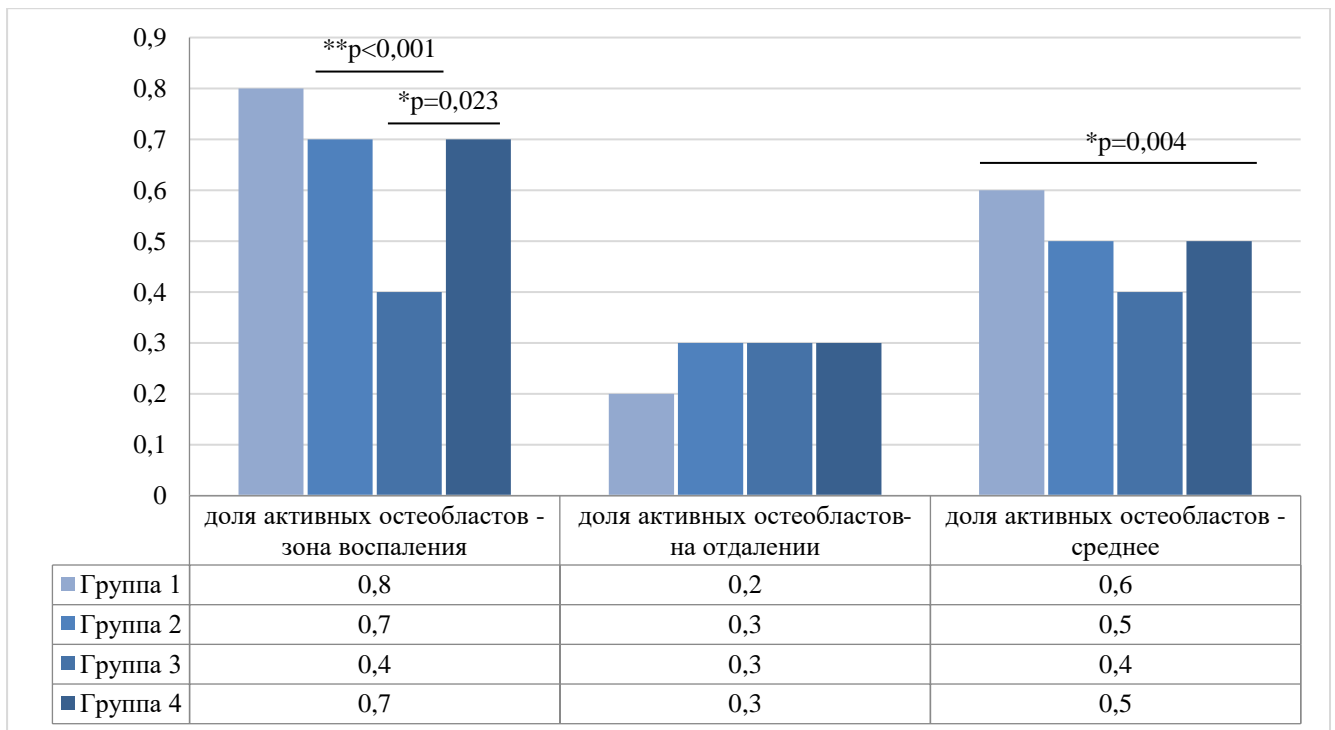


Рисунок 57 - Доля активных остеобластов в эпифизарной зоне (Ме) по всем полям зрения (*стандартизировано на количество клеток эндооста; **стандартизировано на поле зрения) в контрольной точке 3 месяца, Ме

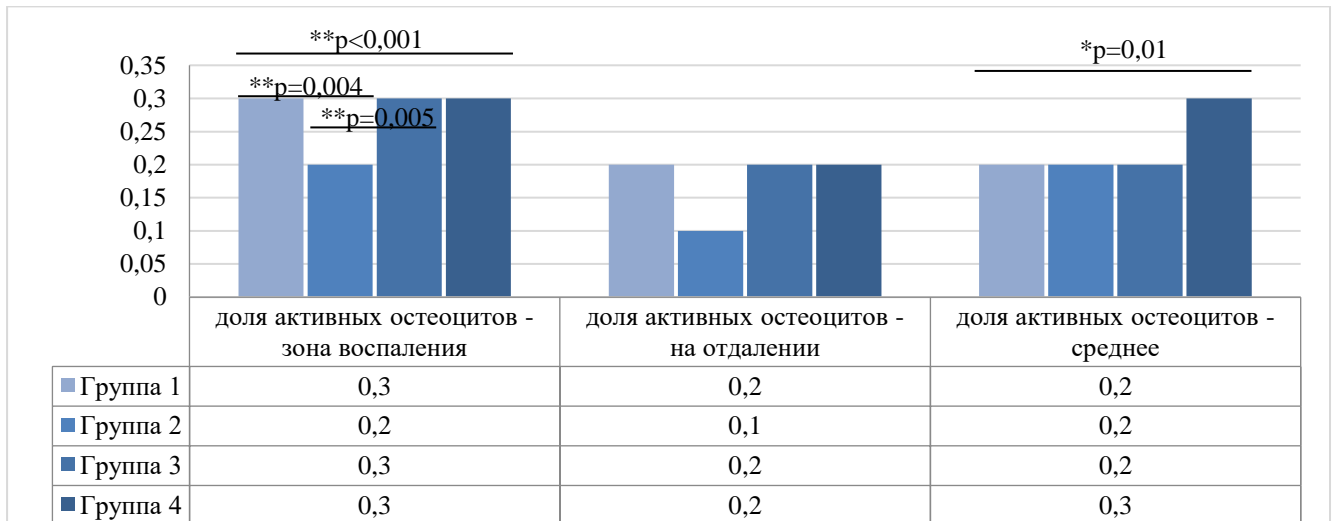


Рисунок 58 - Доля активных остеоцитов (Me) по всем полям зрения (*стандартизировано на количество клеток эндооста; ** стандартизировано на поле зрения) в контрольной точке 3 месяца

Паттерны регенеративного остеогенеза

На сроке 3 месяца по совокупности баллов гистологических паттернов, отражающих активное ремоделирование костной ткани в зоне воспаления, среди групп 2 - 4 выделяются группы 3 и 4: в них больше грануляционной ткани, активной мезенхимы и полнокровных сосудов (Рисунок 59).

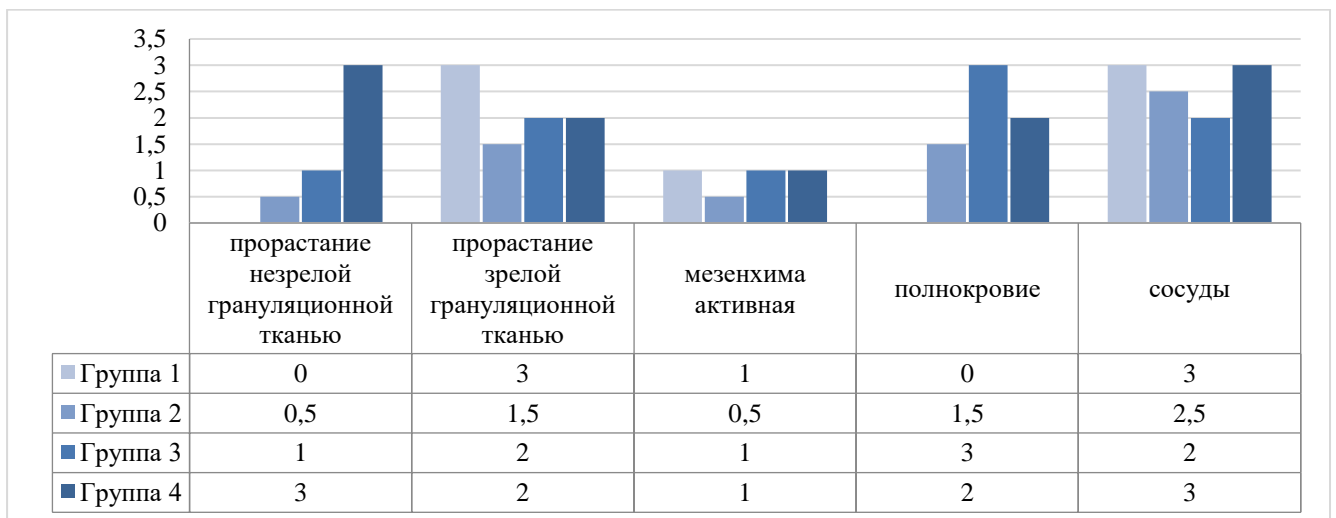


Рисунок 59 - Гистологические паттерны (оценка в баллах от 0 до 3), отражающие активное ремоделирование костной ткани в зоне воспаления. Срок наблюдения 3 месяца

6 месяцев наблюдения

Специфическое воспаление

На сроке наблюдения 6 месяцев на фоне различных режимов терапии в группах 2 - 4 (по сравнению с группой контроля заражения 1) достигнута значительная положительная динамика в виде нивелирования специфического воспаления в 50 - 75% случаев: остаются единичные образцы с текущей активностью 3 - 4 степени, не превышающие 25% от своей группы с преобладанием фазы инфильтрации и отграничения. Распространенность воспаления не превышала к этому сроку 1% в группе 2 (преобладали остаточные продуктивные воспалительные инфильтраты с ремодуляцией костной ткани, 3 ст. акт., КУБ (-)), 42% в группе 3 (выраженный некротизирующийся процесс, 4 ст. акт., КУБ(++)) и 17% в группе 4 (ограниченный очаг некроза, 3 ст. акт. (КУБ (-)). При этом достоверные отличия по течению туберкулезного процесса между группами 2 - 4 не определяются, несмотря на отсутствие ПТТ в группе 4 (Рисунок 60).

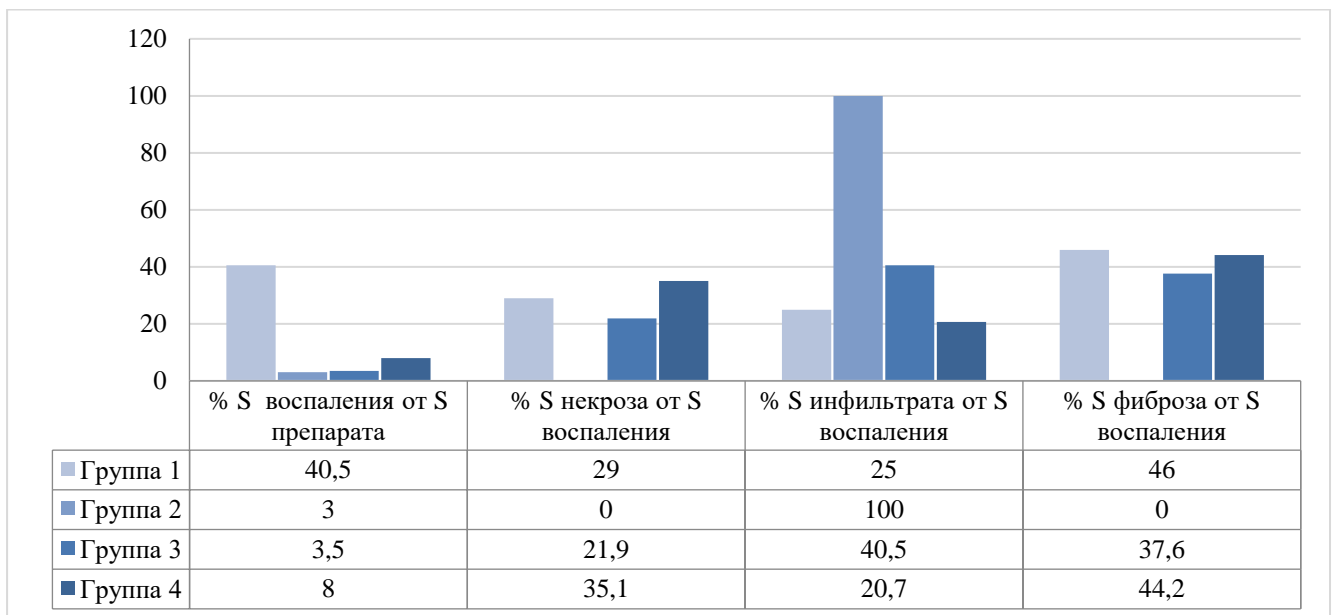


Рисунок 60 - Характер и распространенность специфического воспаления в эпифизах бедренных костей, аутопсированных в контрольной точке 6 месяцев, Me, (S – площадь)

Неспецифическое воспаление

Определяется снижение площади неспецифической инфильтрации в препаратах групп 2 - 4, не имеющих очагов специфического воспаления, по сравнению с наблюдением на сроке 3 месяца. Площадь инфильтрации составляет от 1 до 10%, расположение инфильтратов соответствует локализации гранул имплантата.

Площадь костного матрикса и толщина костных балок

Во всех экспериментальных группах на данном сроке наблюдения % площади костной ткани в эпифизе исследуемой бедренной кости выше, чем с контралатеральной стороны (Рисунок 61). Это утверждение правомочно как при сравнении с медианой значений контралатеральных препаратов, так и при попарном внутригрупповом сравнении. При этом значение средней толщины балок вариабельно и не согласуется со значением площади, однако в группах 3 и 4 значение толщины костных балок выше, чем контралатерально и в группе 2, что косвенно указывает на роль БФ ($p < 0,001$) (Рисунок 62). Из всех групп самые большие значения % площади костной ткани в эпифизе и толщины балок в группе 4.

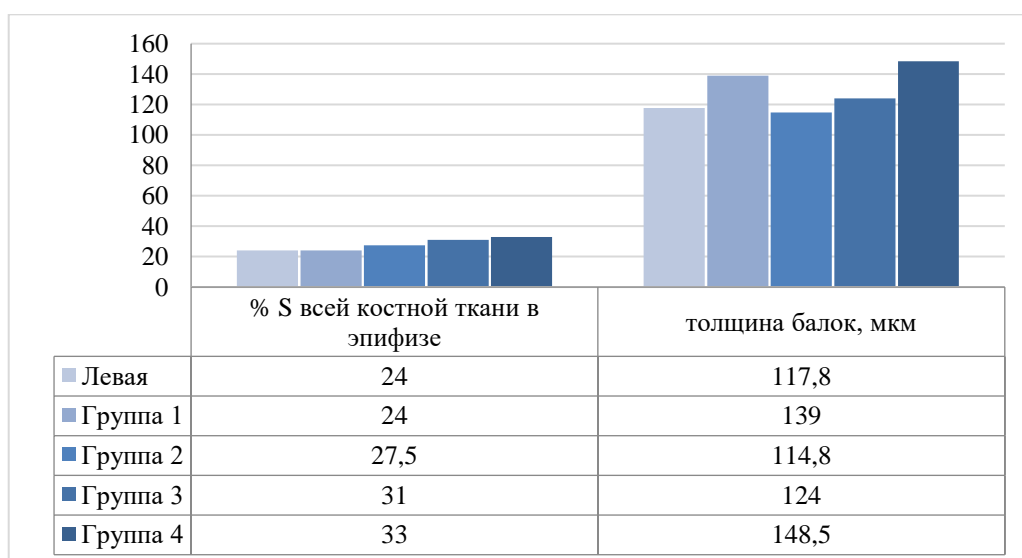


Рисунок 61 - Площадь костной ткани и толщина балок в эпифизарной зоне в контрольной точке 6 месяцев, Ме

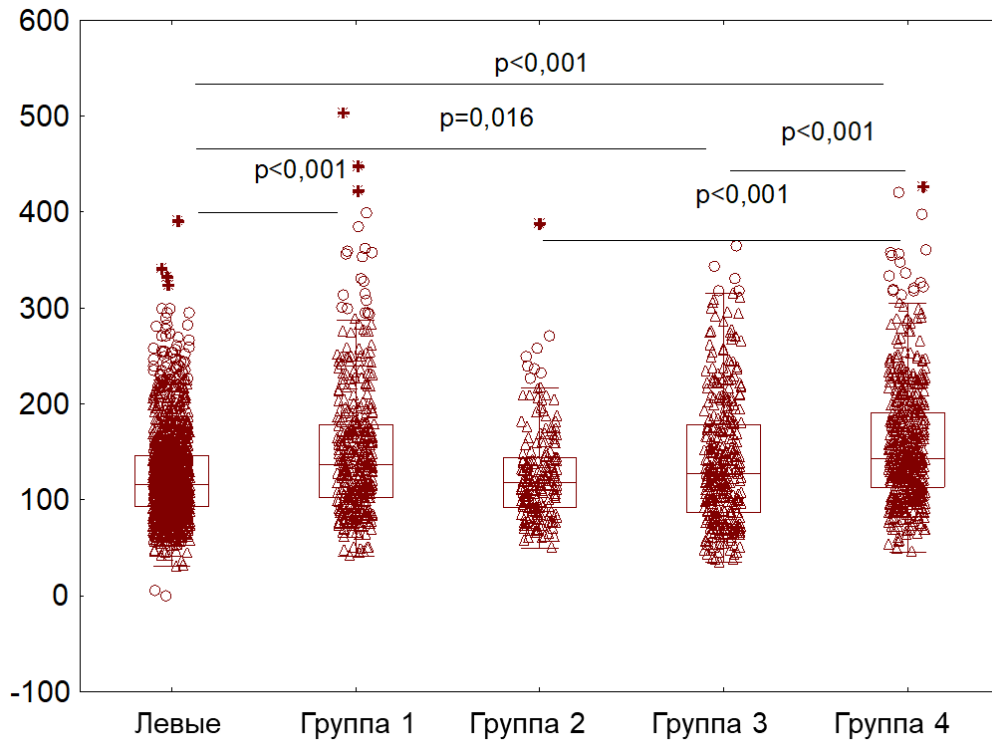


Рисунок 62 - Толщина костных балок в эпифизе в контрольной точке 6 месяцев, мкм

Клеточный состав

Отмечается разное соотношение общего количества, числа активных и неактивных остеобразующих клеток в динамике опыта (Рисунок 63 - Рисунок 66). Максимальное количество остеобластов и остеоцитов, максимальное число активных остеобластов определяется в группе контроля заражения (№1). В группах №3 и №4 отмечен эффект нарастания количества остеобразующих клеток в перифокальных зонах к 6 месяцу - пролонгация остеиндукции несмотря на затихание и регресс специфического воспаления. В контрлатеральных бедренных костях аналогичной зоны (эпифиз) отмечается схожее соотношение и пропорции клеток в группах (за исключением группы 3) – что позволяет сделать вывод от том, что в правых бедренных костях групп №3 и №4 общий показатель остеобразующих клеток выше и нарастает к 6 месяцу на фоне применения БФ.

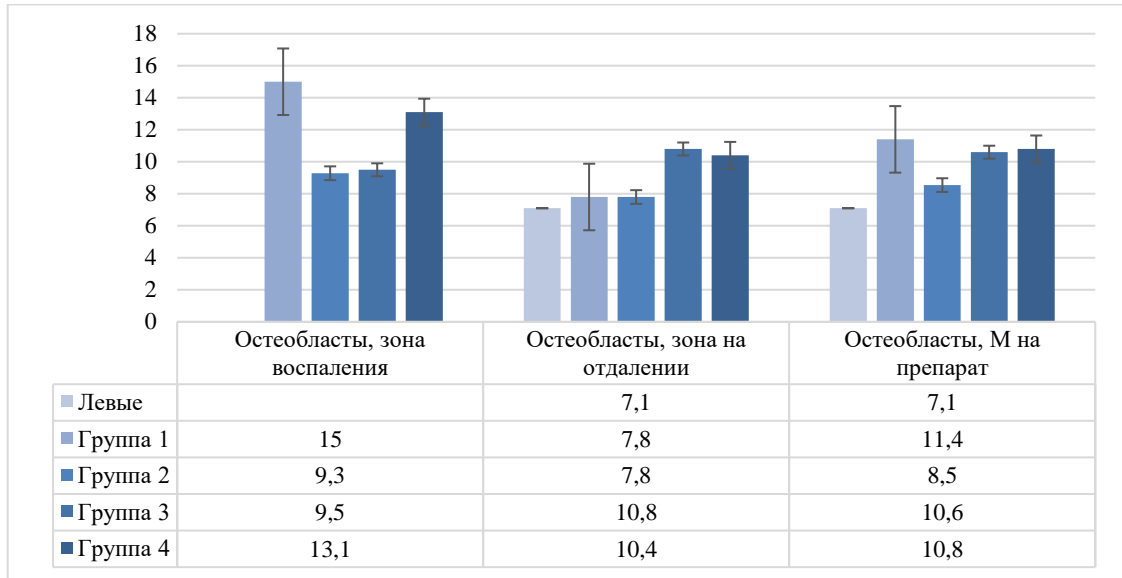


Рисунок 63 - Количество остеобластов в эпифизе на 1 поле зрения в контрольной точке 6 месяцев (ув. x1000), Ме

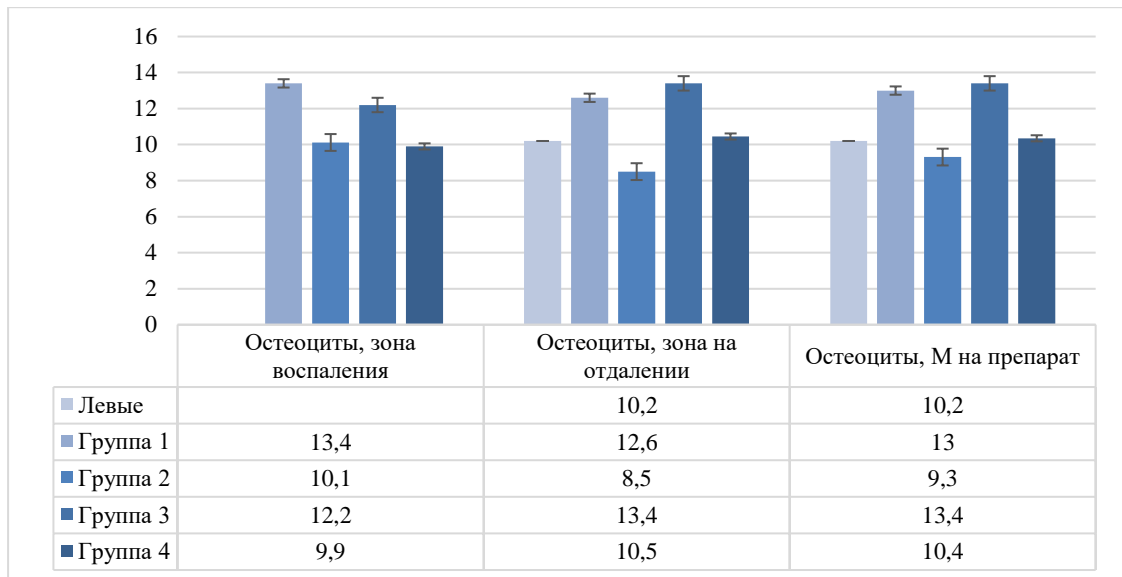


Рисунок 64 - Количество остеоцитов (Ме) на поле зрения в контрольной точке 6 месяцев (ув. x1000)

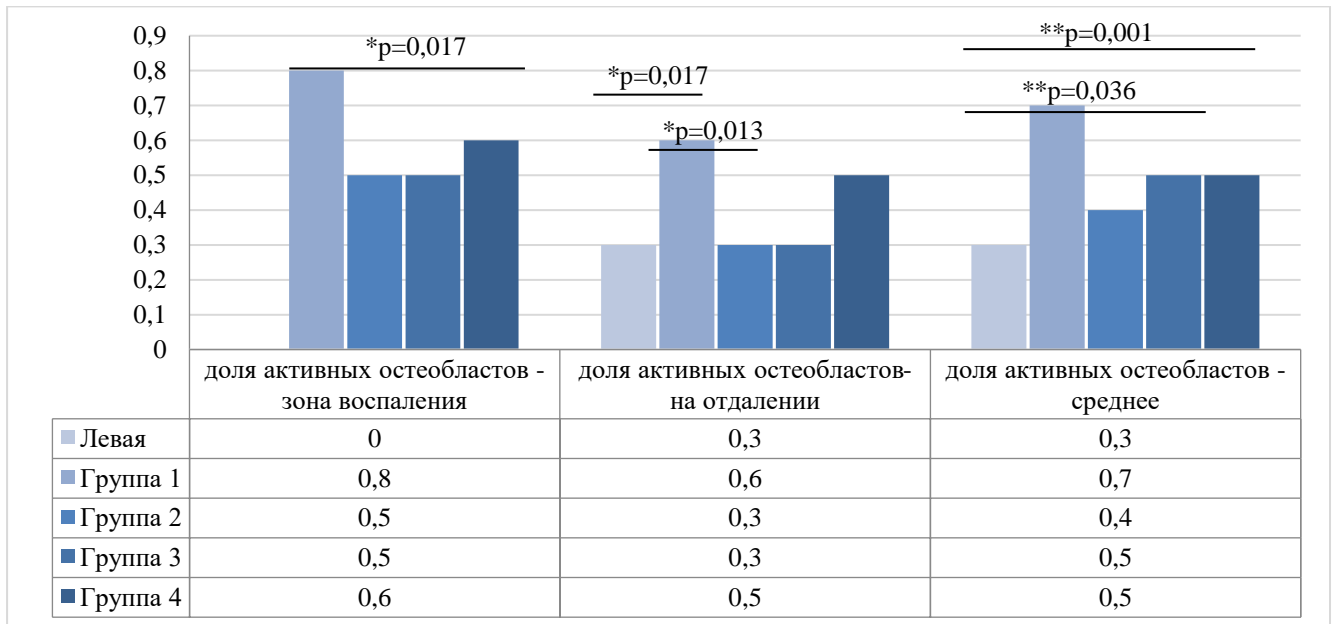


Рисунок 65 - Доля активных остеобластов (Me) в эпифизарной зоне по всем полям зрения (*стандартизировано на количество клеток эндооста; ** стандартизировано на поле зрения) в контрольной точке 6 месяцев

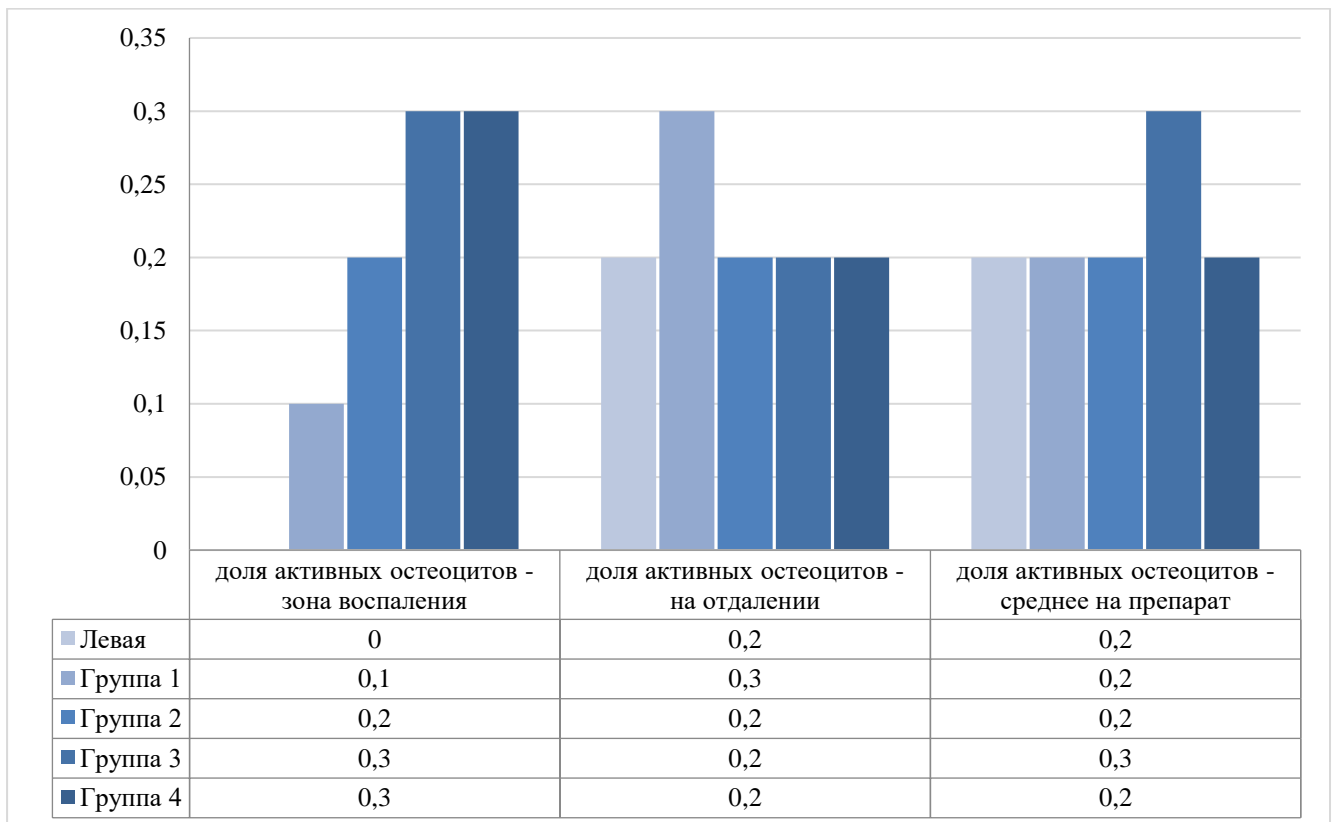


Рисунок 66 – Доля активных остеоцитов (Me) по всем полям зрения в контрольной точке 6 месяцев

Паттерны регенеративного остеогенеза

На данном сроке наблюдения по совокупности баллов гистологических паттернов, отражающих активное ремоделирование костной ткани в зоне воспаления, среди групп, получавших терапию, выделяется группа 4 - в ней больше грануляционной ткани и полнокровных сосудов (Рисунок 67).

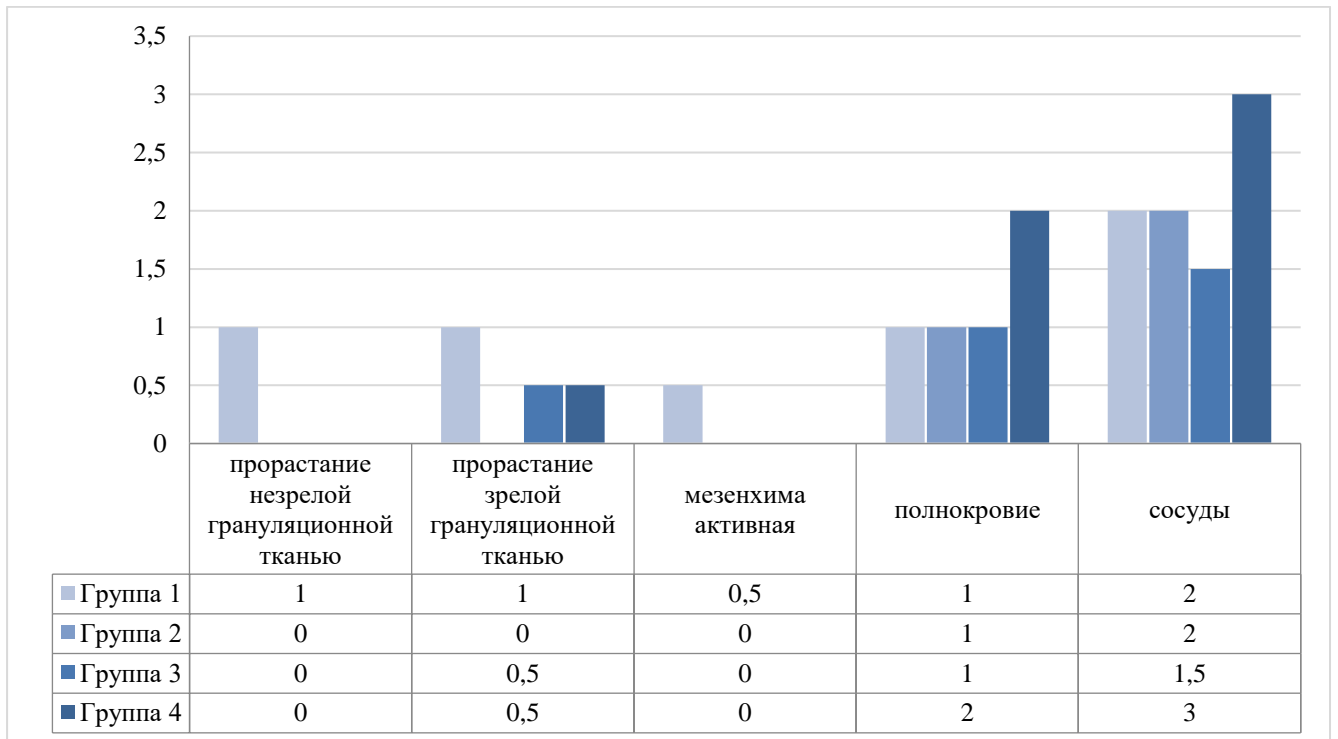


Рисунок 67 - Гистологические паттерны (оценка в баллах от 0 до 3), отражающие активное ремоделирование костной ткани в зоне воспаления. Срок наблюдения 6 месяцев

Заключение

Восстановление костной ткани после специфических инфекционных деструктивных процессов и их оперативного лечения - важная задача современной травматологии и ортопедии. Особенно актуальна данная проблема при развитии заболевания на фоне продолжающегося костного роста, когда неполноценное восстановление кости может приводить к развитию ортопедических осложнений в течение длительного периода после реконвалесценции [14].

Одним из методов воздействия на процессы остеорегенерации после резекции патологических очагов является костная пластика имплантатами с заданными osteoconductive, osteoinductive и osteogenic свойствами, однако, при лечении инфекционных процессов имплантаты более подвержены преждевременному лизису в процессе адаптации и потере указанных свойств. При этом даже при нормально текущей адаптации имплантата большие костные дефекты требуют большего времени для восстановления и, следовательно, иммобилизации и ограничения осевой нагрузки на пораженный сегмент, что само по себе ухудшает условия реваскуляризации и остеогенеза, замедляя процессы остеорегенерации.

Другим методом регуляции остеорегенерации является применение бисфосфонатов – селективных ингибиторов остеолизиса, обладающих не только эффектом торможения дифференцировки остеокластов из предшественников, но и противовоспалительной активностью [27; 67; 136]. Указанные свойства БФ используются при лечении как системных генетических заболеваний (первичный остеопороз) и вторичном остеопорозе (например, при ДЦП), так и при очаговых поражениях костной ткани - костных кистах, метастазах литических опухолей, небактериальном остеомиелите [11; 75; 116; 132; 135]. Имеется лишь единичное упоминание о применении БФ при туберкулезном остите [78]. Теоретически, за счет системного угнетения остеокластов БФ могут улучшить адаптацию имплантата за счет ингибции периимплантного остеолизиса и предотвращения его преждевременной резорбции, а также регулировать механизмы

остеорегенерации благодаря превалированию процессов синтеза костной ткани над ее резорбцией.

Экспериментальное исследование может являться базисом для применения БФ при специфических инфекционных деструкциях костей, а также других заболеваниях, характеризующихся локальным остеопорозом и деструкцией костной ткани (опубликованное в мае 2022 распоряжение МЗ РФ позволяет это делать до внесения соответствующих указаний в действующие инструкции [31]). Таким образом, доказательство эффективности бисфосфонатов при лечении туберкулезных оститов теоретически может экстраполировано на лечение различных нозологических вариантов очаговой костной деструкции.

Целью работы явилось экспериментальное обоснование возможности и эффективности применения бисфосфонатов для оптимизации процессов восстановления костной ткани при лечении туберкулезного остита.

Для реализации поставленной цели в рамках экспериментального исследования использованы лабораторные, инструментальные, научные аналитические и статистические методы. Материалом исследования явилось изучение результатов лечения 21 лабораторного животного с биологической моделью туберкулезного остита. Исследование выполнено в несколько этапов:

первый этап - создание модели туберкулезного остита в медиальном мышечке правой бедренной кости кролика, для чего использована ранее разработанная в экспериментальной лаборатории ФГБУ «СПб НИИФ» методика [36]. При создании модели локальное заражение проводилось чувствительным к химиопрепаратам высокопатогенным лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv (1×10^6 микробных клеток). Подтверждение инфицирования и развития туберкулезного процесса основывалось как на появлении местных клинических проявлений, так и на выявлении иммунного ответа на специфические антигены путем проведения внутрикожной пробы с АТР (Диаскинтест®). Положительный клинический и иммунологический результат заражения зарегистрирован у всех инфицированных животных при контрольной точке 4 недели после заражения;

после подтверждения положительного результата заражения в соответствии со стандартом оказания противотуберкулезной помощи [144; 145] всем животным назначалась противотуберкулезная терапия согласно исходно известной чувствительности лабораторного штамма микобактерий (изониазид — 10 мг/кг, этамбутол и пипразинамид 20 мг/кг перорально 1 раз в день 5 раз в неделю);

3 кролика, у которых в последующем не выполнялась санирующе-пластическая операция и не проводилась противотуберкулезная терапия, выделены в группу 1 (контроль);

через 6 недель после заражения (2 недели после начала ПТТ) 18 животным проведено оперативное лечение в объеме резекции и санации патологических очагов с костной пластикой (по данным ранее проведенных экспериментальных исследований, промежуток времени 6 недель достаточен для развития деструктивного поражения костной ткани [28]). Пострезекционную полость заполняли гранулами имплантата Osteoset®2DBM Pellets (“Wright medical”, USA), обладающего остеокондуктивными и остеоиндуктивными свойствами за счет пористой структуры сульфата кальция и наличия костных морфогенных белков (на момент проведения эксперимента материал имел регистрацию в РФ, стандартизован по форме и составу). Забранный при операции материал из патологических очагов исследован методом ПЦР-РТ; ДНК *M. tuberculosis* обнаружена в 17 из 18 образцов (94,4%).

После операции кролики разделены на 3 группы с учетом продолженного в дальнейшем медикаментозного лечения:

в группе 2 (4 кролика) ПТТ продолжена в прежних дозировках;

в группе 3 (7 кроликов) ПТТ продолжена в прежних дозировках, но через 10 дней после операции выполнено введение препарата памидроновой кислоты в дозировке 1 мг/кг внутривенно медленно;

в группе 4 (7 кроликов) ПТТ отменена, но через 10 дней после операции выполнено введение препарата памидроновой кислоты по той же методике, как в группе 3.

Ни у одного животного из групп 3 и 4 на введение препарата памидроновой кислоты не зафиксированы какие-либо побочные реакции.

Выведение животных групп 2 - 4 из эксперимента проводилось через 3 и 6 месяцев после оперативного лечения; для группы 1 - через 4,5 и 7,5 месяцев после заражения. Проведение аутопсии на первом сроке выведения сопровождалось забором правой бедренной кости (оперированной), на втором – правой (оперированной) и левой (интактной) бедренных костей. Аутопсированный материал фиксировали в 10% растворе забуференного формалина.

Последовательно выполняли микро-КТ-исследование, патоморфологическое и морфометрическое исследования.

В начале исследования и перед выполнением основных этапов (заражение, операция, выведение) выполнялся замер массы тела и забор венозной крови кроликов. Полученная сыворотка замораживалась и была использована после выполнения последнего забора для исследования линейки биологических маркеров, используемых для характеристики процессов остеогенеза.

При оценке массы тела животных прибавки в весе определялись у всех кроликов и составляли от 4,8 до 15,3% за весь период наблюдения. Максимальные весовые прибавки отмечались в группах 3 и 4, получавших памидроновую кислоту, составив соответственно в группе 3 +15,3% за весь период наблюдения и +10,6% от момента хирургического лечения до выведения из эксперимента ($p = 0,04$); в группе 4 - +7,7% и +10,6%, за аналогичные периоды.

Оценка динамики лабораторных показателей демонстрирует угнетение активности общей щелочной фосфатазы во всех группах. Также определяются статистически значимые различия между группами по уровню склеростина через 3 месяца после хирургического лечения ($p = 0,03$) с максимальным значением в контрольной группе (505,8 пмоль/л) и высоким - в группе 3 (405,2 пмоль/л).

Лучевое исследование выполняли с использованием микромографа Skyscan 1172 (Bruker) при размере пикселя 13 и 27 мкм; данные обрабатывались с помощью программ CTAn (Bruker), RadiAnt DICOM Viewer (Medixant, Poland).

Получены микрофотограммы 21 правой бедренной кости и 12 левых бедренных костей.

Анализ *интактных (левых)* бедренных костей позволил получить представление об особенностях архитектоники эпифиза бедренной кости кролика. В частности, максимальное количество и структурность костных трабекул выражена в мыщелках бедренной кости, с постепенным снижением данных параметров по направлению к центральным отделам кости и проксимально к метафизарной пластинке, которая визуализируется достаточно четко. В некоторых препаратах разряжение трабекулярной структуры в центральных отделах принимает вид полостей, которые могли бы быть ошибочно приняты за деструктивные при анализе *правых (инфицированных)* бедренных костей.

Во всех опытных группах определяется вариативность лучевых данных. Внутригрупповой анализ позволил выделить характерные особенности каждой группы:

особенностью группы 1 является нарастание в динамике КТ-признаков остеодеструкции (костные полости, секвестры, отсутствие структурности костной ткани) с максимальной их выраженностью через 7,5 месяцев от момента инфицирования;

в группе 2 на обоих сроках наблюдения определяются костные полости, в 75% случаев (3 из 4 образцов) отсутствует структурность костной ткани. Через 6 месяцев имплантат в реципиентной зоне не визуализируется (резорбирован в 100% случаев), а признаки восстановления костной структуры определяются только у 2 (50%) образцов;

особенностями группы 3 на обоих сроках наблюдения является, с одной стороны, визуализация имплантата и/или его фрагментов у 6 из 7 (85,7 %) образцов и прорастание имплантата костными балками, с другой – выявление костных полостей в 4 из 7 (57%) случаях;

для группы 4 характерно обнаружение имплантата и/или его фрагментов в 100% случаев на обоих сроках наблюдения с выраженным прорастанием костными

балками. На сроке 3 месяца костные полости содержат неоднородное содержимое, костные фрагменты (секвестры), тогда как через 6 месяцев секвестры визуализированы только в 1 случае в небольшом количестве.

Отличительными признаками экспериментальных групп 3 и 4 является сохранение имплантата в 85,7 - 100% случаев даже при наличии костных полостей, а также его прорастание костными балками, тогда как в группе 2 имплантат определяется лишь в половине случаев и только на первом сроке оценки.

Определение костной плотности выполнялось в единицах Хаунсфилда в программе RadiAnt DICOM Viewer на площади 0,001 см². В связи с особенностями калибровки томографа информативные значения получены только для плотности имплантата и колеблются от 27 до 1117 HU с увеличением показателей от группы 2 (174,6 HU - 3 месяца наблюдения, 402,8 HU - 6 месяцев) к группе 4 с максимальными значениями в последней (289,3 HU - 3 месяца наблюдения, 929,7 HU - 6 месяцев).

Выполнена полуколичественная (в баллах от 0 до 2) оценка лучевых признаков остеорегенерации и остеолизиса. Во всех получавших лечение группах 2 - 4 в динамике отмечается нарастание суммы баллов признаков, характерных для остеорегенерации; снижение признаков остеолизиса отмечено в группах 2 и 4. На сроке 3 месяца минимальные значения признаков остеорегенерации определяются в группе 2 (2,5 баллов), максимальные значения остеолизиса - в группе 4 (4 балла). При этом на сроке 6 месяцев в группе 4 отмечены максимальные значения паттернов остеорегенерации (7,5 баллов) и минимальные – остеолизиса (0,5 балла).

Выполнено стандартное гистологическое исследование микропрепаратов, морфологический и морфометрический анализ. Препараты прошли предварительную подготовку по стандартной методике с декальцинацией и изготовлением срезов толщиной 3 - 5 мкм при использовании ротационного микротомы HM 325 (Thermo, USA). Окрашивание срезов выполняли по стандартизированной методике гематоксилином и эозином и по методу Циля - Нельсена для выявления КУМ. Морфометрическое исследование выполнялось по

оцифрованным на сканере изображениям препаратов с использованием программ анализа изображений.

Исследован дистальный эпифиз 12 интактных левых бедренных костей кроликов, аутопсированных через 6 месяцев после оперативного лечения. Морфометрический анализ выполнен у четырех репрезентативных для каждой группы образцов. Ни в одном случае не выявлено специфического поражения, отсутствовали инфильтративные изменения, признаки ремодуляции и фиброобразования. Эпифиз имеет трабекулярное строение, костные балки формируют петлистую сеть, заполняющую пространство всей эпифизарной зоны. Общая площадь, занимаемая костными балками в эпифизарной области, по данным морфометрического исследования, равна 24,0% (18,0; 29,0). Средняя толщина костных балок 117,8 (106,3; 122,8) мкм. Метаэпифизарная пластинка представлена зрелыми костными балками, выражена слабо. Сосудистая сеть развита, представлена сосудами различного калибра венозного и артериального типа. На поверхности костных трабекул обнаруживаются в основном покоящиеся остеобласты. Доля активных остеобластов от клеток эндостальной зоны составляет 0,3, доля активных остеоцитов от общего количества остеоцитов - 0,2. Остеокласты в исследованных образцах не определяются.

В интактных препаратах левой бедренной кости при относительно схожей макроскопической картине и общей костной плотности определяется различное соотношение толщины костных балок и остеоформирующих клеточных элементов, что может указывать на следующие механизмы:

потенцированную системную активацию остеомодуляции во всех костях в группе контроля заражения 1, где определяется максимальное количество активных и неактивных остеобластов при минимальных значениях площади костной ткани и толщины костных балок;

регулирование процесса остеогенеза ПТТ в группах 2 и 3, где отмечена низкая доля активных форм и более низкое общее количество остеоформирующих клеток;

активации и поддержания процессов остеорегенерации на фоне применения БФ в группе 4 подтверждается максимальной толщиной балок, общего количества остеобластов и остеоцитов, долей активных остеоцитов, более ранним переходом активных форм остеобластов в неактивные.

Указанные эффекты специфического воспаления и ПТТ требуют дальнейшего изучения, но не являются предметом исследования в данной работе.

В препаратах **группы 1 (контроль заражения)** определяется нарушение гистоархитектоники эпифизарной зоны из-за ярко-выраженного активного специфического воспаления с эпителиоидно-макрофагальной инфильтрацией и формированием гранулем, которое распространяется на зоны метаэпифиза и диафиза. Специфическое воспаление занимает не менее 40% площади среза кости, вовлекает в процесс суставную поверхность. Метаэпифизарная пластинка не визуализируется в связи с выраженным воспалением. В препаратах выявлены КУМ. В одном из препаратов участок воспаления, лимфо-плазмоцитарный инфильтрат, обрывки капсулы, местами эпителиоидно-макрофагальный инфильтрат отмечаются за надкостницей, в связи с чем модель остита в этом образце не подтверждена и препарат не учитывался при дальнейшем статистическом анализе. Таким образом, у 2 из 3 животных достигнуто развитие специфического воспаления эпифизарной зоны бедренной кости с субтотальным поражением. У одного животного (33,3%) воспалительная инфильтрация выявлена в окружающих тканях над суставной поверхностью эпифиза. Максимальную в сравнении с другими группами толщину костных балок на сроке наблюдения 3 месяца в этой группе ($p < 0,001$) можно объяснить отсутствием хирургического лечения и, соответственно, кюретажа костной ткани. На сроке наблюдения 6 месяцев данный показатель остается в группе 1 выше показателя групп 2 и 3, но ниже, чем в группе 4.

В **группе 2** (оперативное лечение и ПТТ) определяется различная гистологическая картина в зависимости от сроков наблюдения: в препаратах, аутопсированных через 3 месяца после операции гистоархитектоника эпифизарной

зоны нарушена ввиду специфического воспаления, а через 6 месяцев – практически восстановлена; специфическое воспаление определяется в одном препарате и занимает менее 1% площади эпифиза. Фрагменты имплантата определяются только в одном из препаратов. Специфическое воспаление обнаружено в 100 случаев на сроке 3 месяца наблюдения, и в 50% - 6 месяцев. В группе определяется нарастание количества остеокластов в динамике: составляющее 0,2 в поле зрения через 3 месяца и 0,3 – через 6 месяцев, чего не наблюдается в других оперированных группах.

В препаратах **группы 3** (оперативное лечение с последующим проведением ПТТ и введением БФ) на сроке 3 месяца гистоархитектоника эпифизарной зоны изменена из-за воспаления, балочность частично восстановлена, балки образуют толсто-петлистую равномерную сеть; на сроке 6 месяцев - гистоархитектоника сохранена, балочность восстановлена в 75% случаев. В эпифизе балки образуют равномерную тонко- (25%) либо толсто-петлистую сеть (50%). Очаги специфического воспаления выявлены в одном препарате на каждом сроке наблюдения (3 месяца - 33,3% от группы (КУМ « - »), 6 месяцев - 25% (КУМ « + »)). Площадь очагов составляет 50% и 42% от площади препаратов, соответственно. В 75% образцов по данным КТ визуализируются гранулы имплантата в зоне эпифиза и метаэпифиза, на гистологических препаратах в этой зоне визуализируется неспецифическое воспаление, представленное в основном лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией. В этой же зоне обнаруживаются растущие балки с активными остеобластами на поверхности, полнокровные сосуды.

Число остеокластов на сроке 3 месяца достаточно высокое (М на препарат 0,3 в поле зрения), но через 6 месяцев снижается до 0 клеток на всех полях.

На сроке наблюдения 3 месяца в данной группе отмечаются максимальные значения толщины костных балок среди групп 2 - 4 ($p < 0,001$), при наблюдении через 6 месяцев - значение толщины костных балок выше, чем контрлатерально и в группе 2 ($p < 0,001$).

В группе 4 (отмена ПТТ после операции с однократным введением БФ) гистоархитектоника эпифизарной зоны изменена из-за воспаления, балочность частично восстановлена, в эпифизе балки образуют петлистую сеть. Через 3 месяца после операции в 66,6% препаратов визуализируются обширные очаги воспаления в эпифизе, занимающие от 28% до 48% площади, представленные как специфическим воспалением с высокой текущей активностью (4 степень активности), так и неспецифическим - на гранулы имплантата. На сроке наблюдения 6 месяцев специфическое воспаление выявлено только в четверти случаев, его площадь составила 17% от площади эпифиза. В группе отмечаются признаки активного остеогенеза по всем оцениваемым параметрам: доли активных остеобластов/остеоцитов, площадь костной ткани и активный стромальный и сосудистый компонент. При этом число остеокластов среди экспериментальных групп является самым низким и не меняется в динамике (М на препарат 0,1 в п/зр.).

На сроке наблюдения 6 месяцев в этой группе отмечены самые большие процентные значения площади костной ткани в эпифизе и толщины балок.

Характерной особенностью для групп 3 и 4 (применение БФ) является обнаружение стромальных тяжей, представленных фибробласто-фиброцитоподобными клетками, коллагеновыми структурами, которые отходят лучами от зон остаточного неспецифического воспаления вокруг гранул имплантата; увеличенное количество полнокровных сосудов в этих зонах. На костных балках увеличено количество активных остеобластов.

При анализе гистологических паттернов, отражающих активное ремоделирование костной ткани в зоне воспаления, на сроке 3 месяца по совокупности баллов в препаратах групп 3 и 4 отмечено больше грануляционной ткани, активной мезенхимы и полнокровных сосудов. На сроке 6 месяцев наибольшее количество грануляционной ткани и полнокровных сосудов отмечено в группе 4.

Проведенные морфологические и морфометрические исследования показали:

1. Модель туберкулезного остита бедренной кости во всех группах состоятельна с максимальной выраженностью в группе 1 (контроль заражения) и нарастанием площади поражения к 6 месяцу.

2. В группах 2 – 4 максимальные проявления специфического воспаления отмечаются на 3 месяце наблюдения и занимают от 10% до 50% площади эпифиза. КУМ обнаружены в большинстве очагов, при этом на фоне ПТТ, БФ и их комбинации отмечена положительная динамика в виде нивелирования специфического воспаления в 50 - 75% случаев.

3. В образцах присутствует неспецифическое воспаление на гранулы имплантата. Воспалительный перигранулярный инфильтрат имеет иммунный (лимфо-плазмоцитарный) характер с реакциями рассасывания (гранулематозное воспаление). Важной особенностью является остеомодуляция в поле расположения имплантата - выявляются многочисленные растущие костные балки с признаками текущего остеогенеза.

4. Формирование стромальных тяжей (прослоек) с увеличенным количеством сосудов по периферии воспалительных и деструктивных зон является отличительным паттерном в группах назначения БФ - 3 и 4.

5. Снижение числа остеокластов в динамике между 3 и 6 месяцами отмечается во всех исследуемых группах, при этом на сроке 3 месяца оно уже минимально в группах назначения БФ (3 и 4).

6. Выявлена зависимость средней толщины костной балки с количеством активных остеобластов в зоне воспаления ($r = 0,67$, $p = 0,005$) и в целом - во всем эпифизе ($r = 0,54$, $p = 0,029$).

7. В образцах контралатеральной стороны во всех группах (1 – 4) при относительно схожей макроскопической картине и общей костной плотности, определяется различное соотношение толщины костных балок и остеоформирующих клеточных элементов, что может говорить о влиянии как специфического воспалительного процесса, так и медикаментозного воздействия.

8. В опытных группах присутствует значимая вариабельность морфометрических результатов, обусловленная разной гистологической картиной. Это может быть связано с объемом хирургического вмешательства или/и объемом имплантата и его локализацией.

Комплексный анализ результатов морфометрического исследования позволяет сделать вывод о более продолжительном индуцированном остеогенезе в группах с БФ 3 и 4.

При совместном анализе лучевых и морфологических данных установлено, что наличие больших костных полостей не коррелирует с наличием больших специфических инфильтратов только в двух из 9 наблюдений (в одном из препаратов группы 2 площадь специфического воспаления составляет 1% от площади препарата; а в одном препарате группы 3 специфическое воспаление не выявлено.

При соотношении плотности имплантата и количества остеокластов в зоне воспаления и средним на препарат определяется сильная отрицательная корреляция (коэффициент Пирсона - 1) на сроке 3 месяца между группами 2 – 4 и на сроке 6 месяцев - между группами 2 и 4.

При соотношении биохимических и морфологических данных определяется корреляция уровня склеростина и числа остеоцитов с максимальными значениями в группах 1 и 3 (коэффициент Пирсона на сроке 3 месяца равен 1,0; 6 месяцев – 0,9). В совокупности с отсутствием снижения количества остеобластов это может говорить о повышении уровня минеральной плотности и качества костной ткани - повышении трабекулярного объема, более низкой скорости резорбции остеокластами [87]. В рамках проведенного исследования данный тезис подтверждается только выявлением зависимости между толщиной костных балок и уровнем склеростина на сроке наблюдения 3 месяца (коэффициент Пирсона 0,8).

Для остальных показателей статистически значимые различия между группами и в динамике внутри групп отсутствуют, что может быть обусловлено с

одной стороны высокой чувствительностью данных тестов к циркадным ритмам, режиму питания.

Ограничения исследования

1. Как и многие исследования на животных, настоящее исследование ограничено числом наблюдений, что позволяет говорить только о выявленных тенденциях.

2. Исследование на половозрелых животных не позволяет оценить влияние БФ на профилактику развития деформаций пораженного сегмента конечности в процессе роста – это требует иного дизайна экспериментов. Вместе с тем, экстраполируя известные особенности развития деформаций при последствиях туберкулезных оститов [2] и данные систематических обзоров о влиянии БФ на костную ткань [27], можно предположить положительный эффект такого действия у активно растущих организмов.

3. В рамках исследования использован конкретный имплантат с остеокондуктивными и высокими остеоиндуктивными свойствами в сочетании с введением конкретного препарата (памидроновая кислота). Это позволяет сконцентрироваться только на общих выводах, тогда как применение других имплантатов и препаратов может привести к получению либо более точных, либо иных данных.

Выводы

1. Однократное применение бисфосфонатов при лечении экспериментального туберкулезного остита, в том числе на фоне применения противотуберкулезных препаратов, приводит к увеличению площади костной ткани и толщины костных балок как в интактной кости, так и в зоне операции.

2. Применение бисфосфонатов при оперативном лечении экспериментального туберкулезного остита обеспечивает оптимизацию остеорегенерации за счет пролонгирования остеокондуктивных и остеоиндуктивных свойств имплантата с активным остео- и ангиогенезом вокруг его гранул.

3. Однократное применение бисфосфонатов при радикально-восстановительном хирургическом лечении туберкулезного остита ингибирует резорбцию имплантатов.

4. Применение бисфосфонатов совместимо с противотуберкулезной терапией и не увеличивает частоту обнаружения и площадь специфического воспаления после хирургического лечения туберкулезного остита.

5. Однократное применение бисфосфонатов при хирургическом лечении туберкулезного остита сопровождается активацией остеорегенерации с увеличением доли активных форм остеобластов и остеоцитов, увеличением количества грануляционной ткани, активной мезенхимы и полнокровных сосудов в зоне хирургического вмешательства, при этом статистически значимое изменение биохимических маркеров отмечено только в отношении уровня склеростина сыворотки крови.

Перспективы дальнейшей разработки темы исследования

Проведенное экспериментальное исследование доказывает, что даже однократное применение бисфосфонатов при хирургическом лечении туберкулезных оститов обеспечивает пролонгированную индукцию остеогенеза и улучшает адаптацию имплантата, что может препятствовать образованию заполненных рубцовой тканью пострезекционных костных полостей и, соответственно, ортопедических последствий процесса. Предметами последующих исследований могут быть:

изучение отдаленных результатов применения бисфосфонатов в эксперименте при лечении инфекционных деструкций костей;

исследование других модельных животных, в том числе - в периоде их активного роста;

применение бисфосфонатов в клинических условиях после радикально-восстановительных операций при туберкулезном остите в качестве препаратов, тормозящих естественные процессы послеоперационного остеолизиса, а также способствующих пролонгированию действия osteoиндуктивных и osteoкондуктивных свойств имплантатов.

Список сокращений и условных обозначений

АЛ - алендронат

БФ - бисфосфонаты

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КТ – компьютерная томография

КУМ – кислотоустойчивые микроорганизмы

МБТ – Микобактерии туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis complex*)

МРТ – магнитно-резонансная томография

МПКТ – минеральная плотность костной ткани

НБО – небактериальный остеомиелит

п/зр. – поле зрения

ПТТ – противотуберкулезная терапия

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ст. акт. – степень активности

ув. - увеличение

DIRA - Deficiency of the Interleukin - 1 Receptor Antagonist (дефицит антагониста рецептора интерлейкина 1)

PAID - PSTPIP1 - associated autoinflammatory diseases

TNF-а - Фактор некроза опухоли альфа

S - площадь

Список литературы

1. Абрикосов, А. И. Патологическая анатомия / А. И. Абрикосов, А. И. Струков. – Москва : Медгиз, 1961. – 560 с.
2. Алаторцев, А. В. Ортопедические последствия туберкулезных оститов у детей: возможность прогноза и эффективность хирургического лечения : дисс. ... Канд. Мед. наук / А. В. Алаторцев. – 2006. – 155 с.
3. Беллендир, Э.Н. Патогенез внелегочных локализаций туберкулеза / Беллендир, Э.Н. – Внелегочный туберкулез: под ред. А.Б. Васильева. – СПб, 2000. – 36-48 с.
4. Васильев, А. Г. Практикум по патофизиологии. Учебное пособие / А. Г. Васильев, Н. В. Хайцев, А. П. Трашков. – СПб : Фолиант, 2014. – 344 с.
5. Вертебральная форма небактериального остеомиелита: клинико-лабораторная характеристика и особенности лечения / О. Л. Копчак, А. Ю. Мушкин, М. М. Костик, А. С. Малетин // Хирургия позвоночника. – 2016. – Т. 13. – № 3. – С. 90-101.
6. Гарбуз, А. Е. Современное состояние проблемы по внелегочному туберкулезу. Т. 2 / А. Е. Гарбуз. – Проблемы туберкулеза. – СПб, 1998. – 32-34 с.
7. Гематогенный остеомиелит позвоночника: клиническая и микробиологическая характеристика / А. Ю. Базаров, И. А. Лебедев, В. С. Баринов и др. // Хирургия позвоночника. – 2020. – Т. 17. – № 1. – С. 102-109.
8. ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур. - М.: Стандартиформ, 2019. – 38 с.
9. ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами. - М.: Стандартиформ, 2019. – 55 с.
10. ГОСТ ISO 10993-6-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации. - М.: Стандартиформ, 2013. – 78 с.

11. Динамика среднесрочных показателей остеоденситометрии у пациентов с детским церебральным параличом и Spina Bifida, получавших терапию ибандроновой кислотой / В.М. Кенис, А.В. Сапоговский, Т.Н. Прокопенко и др. // Ортопедия, травматология и восстановительная хирургия детского возраста. – 2020. – № 2. – С. 129-136.
12. Замещение аллокостью дефектов костной ткани при доброкачественных опухолях и опухолеподобных заболеваниях / И.А. Кирилова, Е.А. Анастасиева, Е.В. Губина, Л.А. Черданцева – Новосибирск: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2021. – 60 с.
13. Здравоохранение в России / под ред. П.А. Смелова, С.Ю. Никитиной – Стат.сб. - М.: Росстат, 2021. – 173 с.
14. Зедгенидзе Г.А. Рентгенодиагностика костно-суставного туберкулёза / Г.А. Зедгенидзе, В.П. Грацианский, Ф.Ф. Сивенко – Ленинград: Медицина, 1958. – 332 с.
15. Инфекционные поражения позвоночника: Проект национальных клинических рекомендаций / А.Ю. Мушкин, А.А. Вишневский, Э.О. Перецманас и др. // Хирургия позвоночника. – 2019. – Т. 16. – № 4. – С. 63-76.
16. Кириллова, Е.С. Оптимизация лучевой диагностики при туберкулезных оститах у детей младшего возраста : дисс. ... канд. мед. наук / Е.С. Кириллова– 2006. – 126 с.
17. Кирилова, И.А. Вопросы репаративной регенерации в вертебрологии: исторический обзор работ учеников профессора Я.Л. Цивьяна / И.А. Кирилова, Н.Г. Фомичев // Хирургия позвоночника. – 2020. – Т. 17. – № 4. – С. 102-112.
18. Кожевников, О.В. Болезнь Легг-Кальве-Пертеса: этиология, патогенез, диагностика и лечение / О.В. Кожевников, В.А. Лысиков, А.В. Иванов // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 2017. – № 1. – С. 77-87.

19. Комбинированное лечение диффузно-склерозирующего остеомиелита нижней челюсти у детей / А.Ю. Кугушев, А.В. Лопатин, С.А. Ясонов, Д.С. Сеницин // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2019. – Т. 18. – № 3. – С. 46-53.
20. Костно-суставной туберкулез. Т. 1-3 / под ред. Ю.Н. Левашева, А.Е. Гарбуза – Ленинград : Медицина, 1971. – 171 с.
21. Косулин, А. В. Болезни донорской зоны как проблема хирургической вертебры: систематический обзор / А. В. Косулин, Д. В. Елякин // Хирургия позвоночника. – 2016. – Т. 13. – № 2. – С. 45-51.
22. Макро- и микроскопическая диагностика туберкулеза, его осложнений, исходов и причин смерти. Пособие для врачей. / Б. М. Ариэль, Г. Б. Ковальский, О. М. Осташко, О. И. Шацкило. – Санкт-Петербург : Медицина, 1998. – С. 33-34.
23. Мушкин, А. Ю. К вопросу о дифференциальной диагностике небактериального и туберкулезного остеомиелита / А. Ю. Мушкин, М. М. Костик, О. Л. Копчак // Медицинский альянс. – 2018. – № 4. – С. 41-48.
24. Мушкин, А. Ю. Туберкулез костей и суставов у детей: алгоритмирование диагностики и принципы лечения / А. Ю. Мушкин, А. А. Першин, Н. А. Советова // Медицинский альянс. – 2015. – № 4. – С. 36-45.
25. Оперативное лечение кист костей у детей / А. А. Овечкина, К. В. Жердев, О. Б. Челпаченко и др. // Медицинский совет. – 2022. – № 1. – С. 312-318.
26. Оценка влияния электрического поля электрета на остеорепарацию и активность воспаления в процессе хирургического лечения моделированного туберкулезного остита по морфологическим и биохимическим критериям / М. С. Сердобинцев, Т. И. Виноградова, М. Е. Дьякова, Д. С. Эсмедляева // Медицинский альянс. – 2020. – Т. 8. – № 4. – С. 46-58.
27. Петухова, В. В. Применение бисфосфонатов при костной патологии у детей (систематический обзор) / В. В. Петухова, А. Ю. Мушкин, М. М. Костик // Медицинский альянс. – 2021. – Т. 9. – № 3. – С. 59-70.

28. Пластика костных дефектов в хирургии туберкулеза костей и суставов (экспериментальное исследование) / М. С. Сердобинцев, А. С. Кафтырев, О. Л. Луцкая, В. Ю. Лобач // Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции Актуальные проблемы медицины в России и за рубежом. – Новосибирск : Инновационный центр развития образования и науки, 2015. – С. 162-164.

29. Приказ Министерства здравоохранения СССР от 10 марта 1966 г. № 163 Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения. - М : Министерство здравоохранения СССР, 1993. – 53 с.

30. Прогнозирование ортопедических последствий оперированных туберкулезных оститов у детей. / А. В. Алаторцев, Е. С. Кириллова, А. Ю. Мушкин, Т. Б. Ряснянская // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2006. – № 12. – С. 58-61.

31. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 16.05.2022 г. № 1180-р Об утверждении перечня заболеваний или состояний (групп заболеваний или состояний), при которых допускается применение лекарственного препарата в соответствии с показаниями (характеристиками) лекарственного препарата, не указанными в инструкции по его применению. - Москва: Правительство Российской Федерации, 2022. – 3 с.

32. Руководство по легочному и внелегочному туберкулезу / под ред. Ю. Н. Левашева, Ю. М. Репина. – Санкт-Петербург: ЭЛБИ-СПб, 2006. – 516 с.

33. Сакроилиит как маска новообразований в детском возрасте: анализ серии клинических случаев / М. М. Карабахцян, Н. Т. Гарипова, Л. С. Сорокина и др. // Современная ревматология. – 2019. – Т. 13. – № 4. – С. 84-88.

34. Санитарно-эпидемиологические требования к обеспечению безопасности при работе с ПБА. - Москва – 2021.

35. Сердобинцев, М.С. Современная организация хирургической помощи и диспансерное наблюдение больных костно-суставным туберкулезом /

Сердобинцев М.С., Олейник В.В. – Хирургическое лечение костно-суставного туберкулеза. – Санкт-Петербург, 2008. – С. 17–24.

36. Способ моделирования туберкулезного остита различной степени тяжести : пат. 2421823 С1 Росс. Фед. N 2009140048/14. : заявл. 29.10.2009. : опубл. 20.06.2011. / С. Н. Васильева, А. С. Кафтырев, Т. И. Виноградова и др., 2011. – 9 с.

37. Струков, А. И. Патологическая анатомия / А. И. Струков, В. В. Серов. – Москва: Государственное научно-издательство медицинской литературы, 2021. – 880 с.

38. Тарасов, А. Н. Костно-пластические вмешательства при лечении доброкачественных опухолей костей / А. Н. Тарасов // Практическая медицина. – 2019. – Т. 17. – № 1. – С. 59-63.

39. Технология замещения костных полостей аутологичными мезенхимальными стромальными клетками на коллагеновой матрице при экспериментальном хроническом остеомиелите / В. Н. Митрофанов, О. П. Живцов, Н. Ю. Орлинская и др. // Современные технологии в медицине. – 2021. – Т. 13. – № 1. – С. 42.

40. Тогоева, Е. И. Дифференцированный подход к костнопластическим операциям в детской травматологии и ортопедии / Е. И. Тогоева, А. Т. Кобаидзе, К. В. Гагулаева // Сборник статей Международного научно-исследовательского конкурса Лучший исследовательский проект 2021. – Петрозаводск : Международный центр научного партнерства «Новая Наука», 2021. – С. 305-309.

41. Федеральные клинические рекомендации (протокол) по оказанию медицинской помощи пациентам с несовершенным остеогенезом / Н. А. Белова, М. М. Костик, Д. С. Буклаев, Д. А. Попков. – Москва, 2016. – URL: <http://мороздгкб.рф/> (дата обращения: 16.06.2022). – Текст : электронный.

42. Фтизиатрия: национальное руководство : Национальные руководства / Перельман М.И. ред. . – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 512 с.

43. Хирургическое лечение костно-суставного туберкулеза / под ред. Левашева Ю.Н., Мушкина А.Ю. – Санкт-Петербург : ФГБУ «СПб НИИФ», 2008. – 226 с.
44. Эволюция клеточных технологий в лечении нарушений репаративной регенерации костной ткани длинных трубчатых костей (обзор литературы) / М. У. Байдарбеков, А. А. Нурахметов, К. Т. Оспанов, А. С. Кожаков // Вестник Казахского Национального медицинского университета. – 2021. – № 3. – С. 360-366.
45. Этапы гистогенеза остеогенного трансплантата в культуральной среде и реципиентном ложе / А. М. Зайдман, И. А. Шевченко, Е. Л. Строкова и др. // Цитология. – 2019. – Т. 61. – № 5. – С. 370-384.
46. Яблонский, П. К. Фтизиатрия. Национальные клинические рекомендации / П. К. Яблонский. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 240 с.
47. The use of bioactive glass S53P4 as bone graft substitute in the treatment of chronic osteomyelitis and infected non-unions – a retrospective study of 50 patients / T. A. Malat, M. Glombitza, J. Dahmen et al. // Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie. – 2018. – Vol. 156. – № 02. – P. 152-159.
48. A neglected infection in literature: Childhood musculoskeletal tuberculosis – A bibliometric analysis of the most influential papers / M. Held, M.-F. Bruins, S. Castelein et al. // International Journal of Mycobacteriology. – 2017. – Vol. 6. – A neglected infection in literature. – № 3. – P. 229.
49. A randomized, double blind, placebo-controlled trial of alendronate treatment for fibrous dysplasia of bone / A. M. Boyce, M. H. Kelly, B. A. Brillante et al. // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2014. – Vol. 99. – № 11. – P. 4133-4140.
50. A rare case of *Candida glabrata* spondylodiscitis: case report and literature review / M. Gagliano, C. Marchiani, G. Bandini et al. // International Journal of Infectious Diseases. – 2018. – Vol. 68. – A rare case of *Candida glabrata* spondylodiscitis. – P. 31-35.

51. A Systematic Review Supporting the Endocrine Society Clinical Practice Guideline on the Treatment of Hypercalcemia of Malignancy in Adults / M. O. Seisa, T. Nayfeh, B. Hasan et al. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2023. – Vol. 108. – № 3. – P. 585-591.
52. ACR appropriateness criteria ® suspected osteomyelitis, septic arthritis, or soft tissue infection (excluding spine and diabetic foot) / F. D. Beaman, P. F. von Herrmann, M. J. Kransdorf et al. // *Journal of the American College of Radiology*. – 2017. – Vol. 14. – № 5. – P. S326-S337.
53. Acute osteomyelitis and septic arthritis in children / E. Goergens, A. McEvoy, M. Watson, I. Barrett // *Journal of Paediatrics and Child Health*. – 2005. – Vol. 41. – № 1-2. – P. 59-62.
54. Adibi, R. Zoledronic acid targets chemo-resistant polyploid giant cancer cells / R. Adibi, S. Moein, Y. Gheisari // *Scientific Reports*. – 2023. – Vol. 13. – № 1. – P. 419.
55. Al-Agha, A. E. Osteoporosis treatment with zoledronic acid in pediatric population at a university hospital in Western Saudi Arabia: A 13-year experience / A. E. Al-Agha, R. S. Hayatalhazmi // *Saudi Medical Journal*. – 2015. – Vol. 36. – № 11. – P. 1312-1318.
56. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases / D. E. Griffith, T. Aksamit, B. A. Brown-Elliott et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2007. – Vol. 175. – An Official ATS/IDSA Statement. – № 4. – P. 367-416.
57. Annual injection of zoledronic acid improves bone status in children with cerebral palsy and rett syndrome / A. Wiedemann, E. Renard, M. Hernandez et al. // *Calcified Tissue International*. – 2019. – Vol. 104. – № 4. – P. 355-363.
58. Antibiotic therapy of bone and joint infections in children: proposals of the French Pediatric Infectious Disease Group / M. Lorrot, Y. Gillet, C. Gras Le Guen et al. // *Archives de Pédiatrie*. – 2017. – Vol. 24. – № 12. – P. S36-S41.

59. Bachrach, L. K. Clinical review: bisphosphonate use in childhood osteoporosis / L. K. Bachrach, L. M. Ward // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2009. – Vol. 94. – № 2. – P. 400-409.
60. Bacterial osteomyelitis or nonbacterial osteitis in children: a study involving the german surveillance unit for rare diseases in childhood / V. Grote, C. C. G. Silier, A. M. Voit, A. F. Jansson // *Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2017. – Vol. 36. – № 5. – P. 451-456.
61. Bağcıer, F. A rare presentation of hydatid cyst: a case with radial bone involvement / F. Bağcıer, F. H. Tufanoğlu // *Turkish Journal of Parasitology*. – 2020. – Vol. 44. – № 3. – P. 185-186.
62. Bhure, U. Osteoid osteoma: multimodality imaging with focus on hybrid imaging / U. Bhure, J. E. Roos, K. Strobel // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. – 2019. – Vol. 46. – № 4. – P. 1019-1036.
63. Bisphosphonate therapy for unresectable symptomatic benign bone tumors: A long-term prospective study of tolerance and efficacy / F. Cornelis, M. E. Truchetet, N. Amoretti et al. // *Bone*. – 2014. – Vol. 58. – P. 11-16.
64. Bone and Joint Infections / J. Saavedra-Lozano, O. Falup-Pecurariu, S. N. Faust et al. // *Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2017. – Vol. 36. – № 8. – P. 788-799.
65. Bone and joint infections caused by mucormycetes: A challenging osteoarticular mycosis of the twenty-first century / S. J. Taj-Aldeen, M. N. Gamaletsou, B. Rammaert et al. // *Medical Mycology*. – 2017. – P. 691-704.
66. Bone metabolism and inflammatory characteristics in 14 cases of chronic nonbacterial osteomyelitis / Y. Ata, Y. Inaba, H. Choe et al. // *Pediatric Rheumatology*. – 2017. – Vol. 15. – № 1. – P. 56.
67. Chen, Z. Bone inflammation and chronic recurrent multifocal osteomyelitis / Chen Z., L. Cheng, G. Feng // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. – 2018. – Vol. 22. – № 5. – P. 1380-1386.

68. Chondroblastoma: An evaluation of the recurrences and functional outcomes following treatment / D. Özer, Y. Arıkan, V. Gür et al. // *Acta Orthopaedica Et Traumatologica Turcica*. – 2018. – Vol. 52. – Chondroblastoma. – № 6. – P. 415-418.
69. Chronic infection and infected non-union of the long bones in paediatric patients: preliminary results of bone versus beta-tricalcium phosphate grafting after induced membrane formation / M. Rousset, M. Walle, L. Cambou et al. // *International Orthopaedics*. – 2018. – Vol. 42. – № 2. – P. 385-393.
70. Chronic non-bacterial osteomyelitis: a comparative study between children and adults / A. Skrabl-Baumgartner, P. Singer, T. Greimel et al. // *Pediatric Rheumatology*. – 2019. – Vol. 17. – Chronic non-bacterial osteomyelitis. – № 1. – P. 49.
71. Chronic nonbacterial osteomyelitis may be associated with renal disease and bisphosphonates are a good option for the majority of patients / S. Pastore, G. Ferrara, L. Monasta et al. // *Acta Paediatrica*. – 2016. – Vol. 105. – № 7. – P. e328-e333.
72. Chronic recurrent multifocal osteomyelitis (CRMO) - advancing the diagnosis / M. R. Roderick, R. Shah, V. Rogers et al. // *Pediatric Rheumatology Online Journal*. – 2016. – Vol. 14. – № 1. – P. 47.
73. Chronic recurrent multifocal osteomyelitis (CRMO): presentation, pathogenesis, and treatment / S. R. Hofmann, F. Kapplusch, H. J. Girschick et al. // *Current Osteoporosis Reports*. – 2017. – Vol. 15. – № 6. – P. 542-554.
74. Classification of non-bacterial osteitis: retrospective study of clinical, immunological and genetic aspects in 89 patients / A. Jansson, E. D. Renner, J. Ramser et al. // *Rheumatology (Oxford, England)*. – 2007. – Vol. 46. – Classification of non-bacterial osteitis. – № 1. – P. 154-160.
75. Clinical and therapeutic diversity in adult chronic nonbacterial osteomyelitis (CNO) of the sternocostoclavicular region: a meta-analysis / A. T. Leerling, O. M. Dekkers, N. M. Appelman-Dijkstra, E. M. Winter // *Rheumatology*. – 2023. – Vol. 62. – № 2. – P. 512-522.
76. Clinical characteristics and outcomes of culture-negative versus culture-positive osteomyelitis in children treated at a tertiary hospital in central Taiwan / Chen J.

A., H.-C. Lin, H.-M. Wei et al. // *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. – 2021. – Vol. 54. – № 6. – P. 1061-1069.

77. Clinical score for nonbacterial osteitis in children and adults / A. F. Jansson, T. H. Müller, L. Glieria et al. // *Arthritis & Rheumatism*. – 2011. – Vol. 60. – № 4. – P. 1152-1159.

78. Combined effect of Neridronate and specific antibiotic therapy in a case of tuberculous spondylodiscitis / L. Quarta, A. Corrado, N. Melillo et al. // *Rheumatology International*. – 2008. – Vol. 28. – № 5. – P. 495-498.

79. Comparison of denosumab and oral bisphosphonates for the treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis: a systematic review and meta-analysis / L. Jiang, J. Dong, J. Wei, L. Liu // *BMC Musculoskeletal Disorders*. – 2022. – Vol. 23. – № 1. – P. 1027.

80. Comparison of different treatment approaches of pediatric chronic non-bacterial osteomyelitis / M. M. Kostik, O. L. Kopchak, I. A. Chikova et al. // *Rheumatology International*. – 2019. – Vol. 39. – № 1. – P. 89-96.

81. Consensus guidelines on the use of bisphosphonate therapy in children and adolescents: Bisphosphonates in young people / P. J. Simm, A. Biggin, M. R. Zacharin et al. // *Journal of Paediatrics and Child Health*. – 2018. – Vol. 54. – № 3. – P. 223-233.

82. Consensus treatment plans for chronic nonbacterial osteomyelitis refractory to nonsteroidal antiinflammatory drugs and/or with active spinal lesions / Y. Zhao, E. Y. Wu, M. S. Oliver et al. // *Arthritis Care & Research*. – 2018. – Vol. 70. – № 8. – P. 1228-1237.

83. Dealing with chronic non-bacterial osteomyelitis: a practical approach / A. Taddio, G. Ferrara, A. Insalaco et al. // *Pediatric Rheumatology*. – 2017. – Vol. 15. – № 1. – P. 87.

84. Denosumab versus Bisphosphonates for Reducing Fractures in Postmenopausal Women with Osteoporosis: A Meta-Analysis / K. A. Thal, M. Nudy, E. M. Moser, A. J. Foy // *The Journal of the American Board of Family Medicine*. – 2023. – Vol. 36. – № 1. – P. 175-185.

85. Denosumab Versus Bisphosphonates for the Prevention of the Vertebral Fractures in Men with Osteoporosis: An Updated Network Meta-Analysis / P. Li, X. Wu, Y. Li, J. Huang // *Clinical and Investigative Medicine*. – 2022. – Vol. 45. – № 3. – P. E14-22.
86. Does the number of 6-monthly adjuvant zoledronate infusions received affect treatment efficacy for early breast cancer? A sub-study of ABCSG-12 / A.-A. Beltran-Bless, M. J. Clemons, C. Fesl et al. // *European Journal of Cancer*. – 2023. – Vol. 180. – P. 108-116.
87. Dydykina, I. S. Sclerostin and its role in the regulation of bone metabolism / I. S. Dydykina, E. S. Vetkova // *Rheumatology Science and Practice*. – 2013. – Vol. 1. – № 3. – P. 296.
88. Effects of bisphosphonates to treat osteoporosis in children with cerebral palsy: a meta-analysis / M. J. Kim, S.-N. Kim, I.-S. Lee et al. – Text : electronic // *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. – 2015. – Vol. 28. – № 11-12. – URL: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/jpem-2014-0527/html> (date accessed: 03.06.2022). - Text : electronic.
89. Effects of long-term alendronate treatment on a large sample of pediatric patients with osteogenesis imperfecta / F. Lv, Y. Liu, X. Xu et al. // *Endocrine Practice*. – 2016. – Vol. 22. – № 12. – P. 1369-1376.
90. Efficacy and safety of bisphosphonate therapy in children with osteogenesis imperfecta: a systematic review / E. B. G. Rijks, B. C. Bongers, M. J. G. Vlemmix et al. // *Hormone Research in Paediatrics*. – 2015. – Vol. 84. – № 1. – P. 26-42.
91. Efficacy of pamidronate in children with chronic non-bacterial osteitis using whole body MRI as a marker of disease activity / C. S. Bhat, M. Roderick, E. S. Sen et al. // *Pediatric Rheumatology*. – 2019. – Vol. 17. – № 1. – P. 35.
92. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123). – 1991. – URL: <http://www.worldlii.org/int/other/COETSER/1986/1.html> (date accessed: 13.09.2022). – Text : electronic.

93. Hogan, J. I. Mycobacterial musculoskeletal infections / J. I. Hogan, R. M. Hurtado, S. B. Nelson // *Infectious Disease Clinics of North America*. – 2017. – Vol. 31. – № 2. – P. 369-382.
94. Hotim, O. A. Comparative analysis of the results of surgical treatment for bone cysts in children / O. A. Hotim, V. S. Anosov, L. Z. Sychevskii // *Vestnik of Vitebsk State Medical University*. – 2021. – Vol. 20. – № 1. – P. 55-61.
95. How nonbacterial osteomyelitis could be discriminated from tuberculosis in the early stages: the simple algorithm / M. M. Kostik, O. L. Kopchak, A. S. Maletin et al. // *Clinical Rheumatology*. – 2020. – Vol. 39. – № 12. – P. 3825-3832.
96. Impact of antibiotic pretreatment on cultures in children with osteomyelitis and septic arthritis: a retrospective review / A. Lansell, Y. Vasili, P. S. Suchdev et al. // *BMC Pediatrics*. – 2021. – Vol. 21. – № 1. – P. 342.
97. Induced membrane technique with sequential internal fixation: use of a reinforced spacer for reconstruction of infected bone defects / L. Mathieu, L. Tossou-Odjo, N. de l'Escalopier et al. // *International Orthopaedics*. – 2020. – Vol. 44. – № 9. – P. 1647-1653.
98. Iolascon, G. The Rationale for Using Neridronate in Musculoskeletal Disorders: From Metabolic Bone Diseases to Musculoskeletal Pain / G. Iolascon, A. Moretti // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 13. – P. 6921.
99. Khalid, M. Fungal osteomyelitis in a patient with chronic granulomatous disease: Case report and review of the literature / M. Khalid, S. A. Ali // *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*. – 2018. – Vol. 68. – № 9. – P. 1387-1390.
100. Management of osteoarticular fungal infections in the setting of immunodeficiency / S. G. Papachristou, E. Iosifidis, N. V. Sipsas et al. // *Expert Review of Anti-infective Therapy*. – 2020. – Vol. 18. – № 5. – P. 461-474.
101. Masquelet technique and osteomyelitis: innovations and literature review / S. Careri, R. Vitiello, M. S. Oliva et al. // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. – 2019. – Vol. 23. – № 2 Suppl. – P. 210-216.

102. McQuade, M. Use of bisphosphonates in a case of perthes disease / M. McQuade, K. Houghton // *Orthopaedic Nursing*. – 2005. – Vol. 24. – № 6. – P. 393-398.
103. Microbiological characteristics of acute osteoarticular infections in children / C. D. Russell, R. Ramaesh, P. Kalima et al. // *Journal of Medical Microbiology*. – 2015. – Vol. 64. – № 4. – P. 446-453.
104. Musculoskeletal actinomycosis in children: a case report / Y. Mou, Q. Jiao, Y. Wang et al. // *BMC Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 21. – № 1. – P. 1220.
105. Mushkin, A. Y. Multilevel spinal reconstruction in pediatric patients under 4 years old with non-congenital pathology (10-year single-center cohort study) / A. Y. Mushkin, D. G. Naumov, V. A. Evseev // *European Spine Journal*. – 2019. – Vol. 28. – № 5. – P. 1035-1043.
106. New Insights into Adult and Paediatric Chronic Non-bacterial Osteomyelitis CNO / C. M. Hedrich, H. Morbach, C. Reiser, H. J. Girschick // *Current Rheumatology Reports*. – 2020. – Vol. 22. – № 9. – P. 52.
107. Novel alendronate-CGS21680 conjugate reduces bone resorption and induces new bone formation in post-menopausal osteoporosis and inflammatory osteolysis mouse models / A. Larrañaga-Vera, K. S. Toti, J. S. Flatow et al. // *Arthritis Research & Therapy*. – 2022. – Vol. 24. – № 1. – P. 265.
108. Novel approach of treating Gorham-Stout disease in the humerus--Case report and review of literature / R. Ellati, A. Attili, H. Haddad et al. // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. – 2016. – Vol. 20. – № 3. – P. 426-432.
109. Osteogenesis imperfecta / C. Michell, V. Patel, R. Amirfeyz, M. Gargan // *Current Orthopaedics*. – 2007. – Vol. 21. – № 3. – P. 236-241.
110. Osteogenesis imperfecta: practical treatment guidelines / F. Antoniazzi, M. Mottes, P. Frascini et al. // *Paediatric Drugs*. – 2000. – Vol. 2. – № 6. – P. 465-488.
111. Osteogenesis imperfecta: skeletal outcomes after bisphosphonate discontinuation at final height / M. Robinson, P. Trejo, T. Palomo et al. // *Journal of Bone and Mineral Research*. – 2019. – Vol. 34. – № 12. – P. 2198-2204.

112. Osteomyelitis and septic arthritis due to burkholderia pseudomallei: a 10-year retrospective melioidosis study from south china / Wu H., X. Wang, X. Zhou et al. // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2021. – Vol. 11. – P. 654-745.
113. Osteomyelitis in Immunocompromised children and neonates, a case series / B. Foong, K. P. L. Wong, C. J. Jeyanthi et al. // *BMC Pediatrics*. – 2021. – Vol. 21. – № 1. – P. 568.
114. Pamidronate administration may result in anaemia in children with osteogenesis imperfecta / I. Michałus, Z. Nowicka, W. A. Pietras et al. // *Archives of Disease in Childhood*. – 2019. – Vol. 104. – № 9. – P. 906-907.
115. Peltola, H. Acute osteomyelitis in children / H. Peltola, M. Pääkkönen // *New England Journal of Medicine*. – 2014. – Vol. 370. – № 4. – P. 352-360.
116. Pharmacological Interventions Targeting Pain in Fibrous Dysplasia/McCune–Albright Syndrome / A. Tucker-Bartley, D. J. Selen, E. Golden et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 3. – P. 2550.
117. Pharmacological Management of Osteoporosis in Postmenopausal Women: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline / R. Eastell, C. J. Rosen, D. M. Black et al. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2019. – Vol. 104. – № 5. – P. 1595-1622.
118. Plastic and Orthopaedic Interventions and Long-Term Sequelae in Children with Meningococcal Septicemia—40 Years of Experience at the University Children’s Hospital Zurich / J. Elrod, D. Mannhard, C. Mohr et al. // *European Journal of Pediatric Surgery*. – 2019. – Vol. 29. – № 05. – P. 462-469.
119. Robbins basic pathology / V. Kumar, A. K. Abbas, J. C. Aster, J. A. Perkins eds. . – Tenth edition. – Philadelphia, Pennsylvania : Elsevier, 2018. – 935 p.
120. Russell, D. G. Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow / D. G. Russell // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2001. – Vol. 2. – № 8. – P. 569-578.

121. Scoliosis in osteogenesis imperfecta caused by COL1A1/COL1A2 mutations — genotype–phenotype correlations and effect of bisphosphonate treatment / A. Sato, J. Ouellet, T. Muneta et al. // *Bone*. – 2016. – Vol. 86. – P. 53-57.
122. Severe bilateral Legg-Calvé-Perthes resolved with pamidronate in combination with casts, physiotherapy and adductor tenotomy: a pictorial essay over 11 years / L. Logan, S. Haider, C. Brauer, P. M. Miettunen // *BMJ Case Reports*. – 2019. – Vol. 12. – № 9. – P. e229919.
123. Severe osteogenesis imperfecta Type-III and its challenging treatment in newborn and preschool children. A systematic review / J.-J. Sinikumpu, M. Ojaniemi, P. Lehenkari, W. Serlo // *Injury*. – 2015. – Vol. 46. – № 8. – P. 1440-1446.
124. Side effects of incardronate disodium compared to pamidronate disodium in the treatment of bone metastasis pain: a systematic review and meta-analysis / Y. Wang, Z. Tang, R. Meng, L. He // *Annals of Palliative Medicine*. – 2021. – Vol. 10. – № 11. – P. 11950-11959.
125. Simm, P. J. Successful treatment of a sacral aneurysmal bone cyst with zoledronic acid / P. J. Simm, M. O’Sullivan, M. R. Zacharin // *Journal of Pediatric Orthopaedics*. – 2013. – Vol. 33. – № 5. – P. e61-e64.
126. Single-stage treatment of infected tibial non-unions and osteomyelitis with bone marrow granulocytes precursors protecting bone graft / P. Hernigou, A. Dubory, Y. Homma et al. // *International Orthopaedics*. – 2018. – Vol. 42. – № 10. – P. 2443-2450.
127. Soft tissue and bone tumours : World health organization classification of tumours / Organisation mondiale de la santé, Centre international de recherche sur le cancer eds. . – 5th ed. – Geneva : OMS, 2020. – Vol. 3. – 368 p.
128. The Effect of Withholding Antibiotics Prior to Bone Biopsy in Patients With Suspected Osteomyelitis: A Meta-analysis of the Literature / P. A. Crisologo, J. La Fontaine, D. K. Wukich et al. // *Wounds: A Compendium of Clinical Research and Practice*. – 2019. – Vol. 31. – № 8. – P. 205-212.

129. The effects of intravenous pamidronate on the bone tissue of children and adolescents with osteogenesis imperfecta / F. Rauch, R. Travers, H. Plotkin, F. H. Glorieux // *Journal of Clinical Investigation*. – 2002. – Vol. 110. – № 9. – P. 1293-1299.
130. The efficacy of allograft bone using titanium mesh in the posterior-only surgical treatment of thoracic and thoracolumbar spinal tuberculosis / B. Wang, W. Hua, W. Ke et al. // *BMC Surgery*. – 2020. – Vol. 20. – № 1. – P. 133.
131. The efficacy of single posterior debridement, bone grafting and instrumentation for the treatment of thoracic spinal tuberculosis / Z. Yi, Q. Song, J. Zhou, Y. Zhou // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 3591.
132. The long-term effects of switching from active intravenous bisphosphonate treatment to low-dose maintenance therapy in children with osteogenesis imperfecta / A. Biggin, L. Zheng, J. N. Briody et al. // *Hormone Research in Paediatrics*. – 2015. – Vol. 83. – № 3. – P. 183-189.
133. The many faces of pediatric chronic recurrent multifocal osteomyelitis : a practical location- and case-based approach to differentiate / S. J. Menashe, H. Aboughalia, Y. Zhao et al. // *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. – 2021. – Vol. 54. – № 2. – P. 391-400.
134. The microbiology of chronic osteomyelitis: Changes over ten years / M. Dudareva, A. J. Hotchen, J. Ferguson et al. // *Journal of Infection*. – 2019. – Vol. 79. – The microbiology of chronic osteomyelitis. – № 3. – P. 189-198.
135. The peculiarities and treatment outcomes of the spinal form of chronic non-bacterial osteomyelitis in children: a retrospective cohort study / M. M. Kostik, O. L. Kopchak, A. S. Maletin, A. Yu. Mushkin // *Rheumatology International*. – 2020. – Vol. 40. – № 1. – P. 97-105.
136. Treatment of chronic recurrent multifocal osteomyelitis with bisphosphonates in children / J. Sułko, M. Ebisz, S. Bień et al. // *Joint Bone Spine*. – 2019. – Vol. 86. – № 6. – P. 783-788.
137. Treatment of Hypercalcemia of Malignancy in Adults: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline / G. El-Hajj Fuleihan, G. A. Clines, M. I. Hu et al. //

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2023. – Vol. 108. – № 3. – P. 507-528.

138. Treatment response and longterm outcomes in children with chronic nonbacterial osteomyelitis / A. Schnabel, U. Range, G. Hahn et al. // The Journal of Rheumatology. – 2017. – Vol. 44. – № 7. – P. 1058-1065.

139. Trends in anti-osteoporotic medication utilization following fragility fracture in the USA from 2011 to 2019 / A. R. Agarwal, J. S. Cohen, A. Jorgensen et al. // Osteoporosis International. – 2023. – Vol. 34. – № 2. – P. 379-385.

140. Utilization of ring-shaped bone allograft for surgical treatment of adolescent post-tubercular kyphosis: A retrospective study / X. Yin, P. Liu, Y. Liu et al. // Medicine. – 2017. – Vol. 96. – № 24. – P. e7132.

141. Wedam, A. J. Invited commentary ‘Comparison of three different bone graft methods for single segment lumbar tuberculosis: A retrospective single-center cohort study / A. J. Wedam, B. Xun // International Journal of Surgery. – 2020. – Vol. 80. – P. 19-20.

142. Whole-body MRI in patients with non-bacterial osteitis: Radiological findings and correlation with clinical data / A. P. Arnoldi, C. L. Schlett, H. Douis et al. // European Radiology. – 2017. – Vol. 27. – № 6. – P. 2391-2399.

143. Wong, M. Systematic review of kingella kingae musculoskeletal infection in children: epidemiology, impact and management strategies / M. Wong, N. Williams, C. Cooper // Pediatric Health, Medicine and Therapeutics. – 2020. – Vol. Volume 11. – P. 73-84.

144. World Health Organization. Global tuberculosis report 2013 / World Health Organization. – Geneva : World Health Organization, 2013. – WHO/HTM/TB/2013.11. – URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/91355> (date accessed: 05.06.2022). – Text : electronic.

145. World Health Organization. Global tuberculosis report 2020 / World Health Organization. – Geneva : World Health Organization, 2020. – URL:

<https://apps.who.int/iris/handle/10665/336069> (date accessed: 22.07.2022). – Text : electronic.

146. World Health Organization. Treatment of tuberculosis: guidelines / World Health Organization. – Text : electronic. – 2010. – Treatment of tuberculosis. – URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44165> (date accessed: 05.06.2022). – Text : electronic.

147. Yield of image-guided needle biopsy for infectious discitis: a systematic review and meta-analysis / A. L. McNamara, E. C. Dickerson, D. M. Gomez-Hassan et al. // American Journal of Neuroradiology. – 2017. – Vol. 38. – № 10. – P. 2021-2027.

148. Zhuang, M. Effectiveness and safety of percutaneous kyphoplasty combined with zoledronic acid in treatment of osteoporotic vertebral compression fractures: a meta-analysis / M. Zhuang, B. Cai, F. Wang // Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery. – 2021. – Vol. 142. – № 10. – P. 2435-2443.

149. Zoledronic acid versus alendronate in the treatment of children with osteogenesis imperfecta: a 2-year clinical study / F. Lv, Y. Liu, X. Xu et al. // Endocrine Practice. – 2018. – Vol. 24. – Zoledronic Acid Versus Alendronate In The Treatment of Children With Osteogenesis Imperfecta. – № 2. – P. 179-188.

150. Adjunctive Zoledronate + IL-2 administrations enhance anti-tuberculosis $V\gamma 2V\delta 2$ T-effector populations, and improve treatment outcome of multidrug-resistant tuberculosis1 / H. Shen, E. Yang, M. Guo et al. // Emerging Microbes & Infections. – 2022. – Vol. 11. – № 1. – P. 1790-1805.

151. Criteria for differentiation of non-bacterial and haematogenous osteomyelitis: a case-control study with prospective verification of the outcomes / M. M. Kostik, O. L. Kopchak, A. I. Taschilkin et al. // Current pediatrics. – 2019. – Vol. 17. – № 6. – P. 458-464.

152. Zoledronic acid (zoledronate) in children with osteogenesis imperfecta / L. M. Sánchez-Sánchez, A. U. Cabrera-Pedroza, G. Palacios-Saucedo, B. de la Fuente-Cortez // Gaceta Medica De Mexico. – 2015. – Vol. 151. – № 2. – P. 164-168.