

На правах рукописи

Петухова Вероника Витальевна

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

3.1.9. Хирургия

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

г. Санкт-Петербург

2023 год

Работа выполнена на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

Мушкин Александр Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор

Костик Михаил Михайлович, доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Ткаченко Александр Николаевич

доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра травматологии и ортопедии, профессор

Кирилова Ирина Анатольевна

доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я. Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заместитель директора по научной работе

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»

Защита диссертации состоится «20» июня 2023 в _____ на заседании диссертационного совета 21.1.065.01 созданного на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д.2-4, тел. (812)775-75-55).

С диссертацией можно ознакомиться на официальном сайте федерального государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации www.spbniiif.ru и в научной библиотеке (191036, г. Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2-4, тел. (812) 775-75-55).

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д.м.н., проф.

Виноградова Татьяна Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Костный туберкулез – частная форма органного туберкулеза, характеризующаяся развитием внутрикостных очагов специфического воспаления с гематогенным путем инфицирования и первично-хроническим течением [Гарбуз А.Е., 1998; Hogan J. I. et al., 2017; Струков А.И., Серов В.В., 2021], при этом наличие ограниченных форм (оститов) чаще отмечается у пациентов в периоде активного костного роста [Левашев Ю. Н., Мушкин А. Ю., 2008]. Современное комплексное лечение туберкулезного остита включает хирургическую резекцию патологических очагов и проведение длительной противотуберкулезной терапии (ПТТ), подобранной согласно чувствительности штамма микобактерий [Перельман М. И., 2007; Браженко Н. А., 2013; WHO, 2011 - 2020]. Анатомические и ортопедические последствия туберкулезных оститов развиваются в течение длительного периода после излечения процесса на фоне формирования постдеструктивных рубцовых полостей при отсутствии полноценного восстановления костной ткани [Алаторцев А. В., 2006; Сердобинцев М.С. 2008].

Возможности оптимизации восстановления костной ткани после хирургических вмешательств изучены достаточно подробно [Зайдман А.М. и др., 2019, Кирилова И.А. и др., 2021], однако, сам факт инфекционного процесса обычно рассматривается как ограничение к применению костно-пластических материалов. Среди методов ее регуляции особый интерес представляют бисфосфонаты [Simm P. J. et al., 2018], за счет селективной ингибиции остеокластов теоретически эффективные как при первой фазе локальной перестройки костных имплантатов (лизисе), так и в качестве компонента патогенетической терапии системных остеопорозов и локальных деструкций костей [Кенис В. М. и др., 2020; Kostik M. M. et al., 2020].

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 osteoconductive и osteoinductive 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 osteoconductive и osteoinductive 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 анализа.

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 «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, оценки перспектив дальнейшей разработки темы и списка использованной литературы, включающего 46 отечественных и 106 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 3 таблицами и 67 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении определены основные понятия, используемые в диссертационном исследовании, оценено текущее состояние научной проблемы, сформулированы цели, задачи и основные положения работы.

В первой главе (обзор литературы) раскрыты вопросы, касающиеся туберкулезного остита как специфического варианта хронических очаговых деструктивных заболеваний скелета; методов регуляции восстановления костной ткани, а также применения бисфосфонатов.

Во второй главе представлена характеристика объекта исследования, в которое включены результаты наблюдения за 21 кроликом-самцом породы «Советская шиншилла», полученных из сертифицированного питомника ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» ФГБУ «Национальный центр «Курчатовский институт» и содержащихся в условиях сертифицированного вивария с контролируемыми условиями окружающей среды.

Методика эксперимента

Экспериментальная часть исследования выполнена на базе лаборатории экспериментального туберкулеза и инновационных технологий ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России. Исследование включало 6 основных контрольных точек (Рисунок 1) и статистическую обработку материала:

Точка 1. Определение исходных показателей массы тела кроликов, забор периферической крови, *создание модели туберкулезного остита* в медиальном мышечке *правой* бедренной кости согласно ранее разработанному и зарегистрированному методу заражения [Васильева С. Н. и др., 2011] с использованием в качестве инфекционного агента трехнедельного лекарственно-чувствительного штамма *M. tuberculosis* H37Rv (заражающая доза 1×10^6 микробных клеток/0,2 мл; ТВС # 1/47, источник – Институт гигиены и эпидемиологии, Прага, 1976), полученного из ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России.

Точка 2. Контроль эффективности модели костного туберкулеза проводили через 4 недели после заражения *методом кожных проб* с аллергеном туберкулезным рекомбинантным - АТР (Диаскинтест®). После подтверждения эффективности модели выделена *группа 1* (контроль заражения, 3 кролика): животные этой группы в динамике опыта не получали ни противотуберкулезную терапию, ни хирургическое лечение;



Рисунок 1 - Схема исследования

БФ – бисфосфонаты, ПТТ – противотуберкулезная терапия

Точка 3. Оставшимся кроликам *назначалась ПТТ* с учетом известной чувствительности лабораторного штамма микобактерии - изониазид 10 мг/кг, этамбутол 20 мг/кг и пиразинамид 20 мг/кг перорально 5 раз в неделю. Через 6 недель после заражения у кроликов определена масса тела, проведен забор периферической крови на лабораторное исследование, после чего всем животным проведено *оперативное вмешательство* - некрсеквестрэктомия деструктивного очага (удаленный материал исследован методом ПЦР в режиме реального времени) с замещением операционного дефекта гранулами имплантата Osteoset®2DBM Pellets (Wright Medical Technology, Inc., USA), обладающего остеокондуктивными и остеоиндуктивными свойствами.

Точка 4. В зависимости от варианта последующего медикаментозного лечения животные разделены на 3 опытные группы:

группа 2 (n = 4) - ПТТ продолжалась до завершения эксперимента;

группа 3 (n=7) - через 10 дней после операции однократно осуществлено введение БФ, ПТТ продолжена до завершения эксперимента;

группа 4 (n=7) - ПТТ после операции отменена до завершения эксперимента, на 10 сутки после нее выполнено однократное введение БФ.

Через 10 дней после контрольной точки 3 выполнены определение массы тела и забор периферической крови кроликов.

Введение препарата «Памидроната Медак» (Impfstoffwerk Dessau-Tornau, GmbH, Germany) в группах 3 и 4 осуществлено однократно внутривенно капельно в дозировке 1 мг/кг разведенного в 20 мл раствора NaCl 0,9%. Инфузия проводилась с помощью инфузомата в течение 10 мин.

Точка 5. Определение массы тела и забор периферической крови через 3 месяца после хирургического лечения. ***Выведение из эксперимента 50% животных.*** Забор аутопсийного материала: диафиз и дистальный эпиметафиз *правой* (оперированной) бедренной кости.

Точка 6. Определение массы тела и забор периферической крови через 6 месяцев после хирургического лечения. ***Выведение из эксперимента 100% животных.*** Забор аутопсийного материала: диафиз и дистальный эпиметафиз *правой* (оперированной) и *левой* (интактной) бедренных костей.

Точка 7. Статистическая обработка результатов исследования.

Наблюдение, исследуемые данные, эвтаназия

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 определяли следующие маркеры остеорегенерации:

остеосинтеза - концентрацию общей щелочной фосфатазы (фермента, вырабатываемого остеобластами); альбумина; остеокальцина (неколагенового белка костной ткани, вырабатываемого остеобластами при участии витамина К и

частично высвобождаемого в кровотоке, характеризующего темпы (скорость) минерализации 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 специальные наборы для иммуноферментного анализа Rabbit Osteocalcin, Rabbit beta-CTx, Rabbit receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (ELISA Kit, China), Rabbit Sclerostin (MyBioSource, Canada).

В динамике оценивалось состояние, физическая активность животных, потребление ими воды и питания. Кролики выводились из эксперимента в соответствии с принципами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях. ETS N 123, 1991» и ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур», путем введения в краевую ушную вену раствора лидокаина 10% в дозе, в 5 раз превышающей максимальную допустимую.

После эвтаназии у всех животных проводили забор правой бедренной кости, а у выведенных из эксперимента через 6 месяцев - также левой бедренной кости.

Макроскопическую оценку препарата выполняли путем визуализации зоны операции, периферических костных разрастаний, формы и макроструктуры препарата.

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

Лучевые исследования проводили совместно с сотрудниками ФГБУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» с использованием микротомографа Skyscan-1172 (Bruker microCT, Belgium) при размере пикселя 13 и 27 мкм. Реконструкция при помощи программы Nrecon (Micro Photonics Inc, USA),

обработка реконструированных изображений - в программах STAn (STAN Team, Germany), RadiAnt DICOM Viewer (Medixant, Poland). Выполнялась оценка эпиметафиза правой бедренной кости в соответствии с разработанной оригинальной условной качественно-количественной шкалой: в баллах оценены пять признаков, характеризующих остеорегенерацию, и два признака остеолитического.

Гистологическое исследование микропрепаратов и морфологический анализ воспалительных и регенераторных процессов в тканях выполняли после микроКТ-исследования на базе ООО «Межрегиональный лабораторный центр» (г. Санкт-Петербург) на сертифицированном оборудовании при консультировании врачом-морфолога Н.М. Блюм.

Морфометрическое исследование выполняли по отсканированным 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).

Описательным методом оценивали [Ариэль Б.М. и др., 2000]:

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

Морфометрическим методом в 10 полях зрения при увеличении $\times 1000$ выполняли оценку:

- количества и распределения клеток, характеризующих остеорегенерацию и ремодуляцию - остеобластов, остеокластов и остеоцитов;

– 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.

Морфометрически также оценивали:

– параметры площадей костной ткани (в % от площади кости);
– параметры площадей специфического воспаления с разделением на зоны некроза, инфильтрата и фиброза (в % от площади кости и % от площади воспалительных изменений);

– толщину костных балок (мкм) в эпифизарной части дистальных участков бедренных костей.

Статистический метод

Исследуемые параметры внесены в базы данных и подвергнуты статистической обработке при помощи программ Microsoft Exel (Microsoft, USA), и STATISTICA 12 (Dell, Inc., USA); характер распределения определяли с использованием критерия Шапиро-Уилка, применяли 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

В период наблюдения у 20 из 21 животных определялось удовлетворительное состояние, хорошая физическая активность, удовлетворительное потребление воды и питания. Неудовлетворительное состояние одного кролика (группа 1) было обусловлено генерализацией туберкулеза через 4,5 месяца после инфицирования.

Осложнения со стороны операционной раны в виде подкожного абсцесса отмечены у одного животного группы 3 - купированы на фоне местного лечения.

У всех животных после моделирования остита зарегистрирован положительный результат на внутрикожное введение АТР, свидетельствующий о специфической сенсбилизации.

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

Выявленные статистически значимые различия в исходных показателях массы тела животных группы 2 и других групп (Рисунок 2) можно объяснить анатомо-физиологическими особенностями животных.

Результаты лабораторных исследований

Идентификацию возбудителя в образцах костной ткани кроликов осуществляли молекулярно-генетическим методом ПЦР в режиме реального времени на ДНК МБТ, в 20/21 образцов получен положительный результат.

Во всех группах в динамике определяется угнетение активности общей щелочной фосфатазы (Рисунок 3).

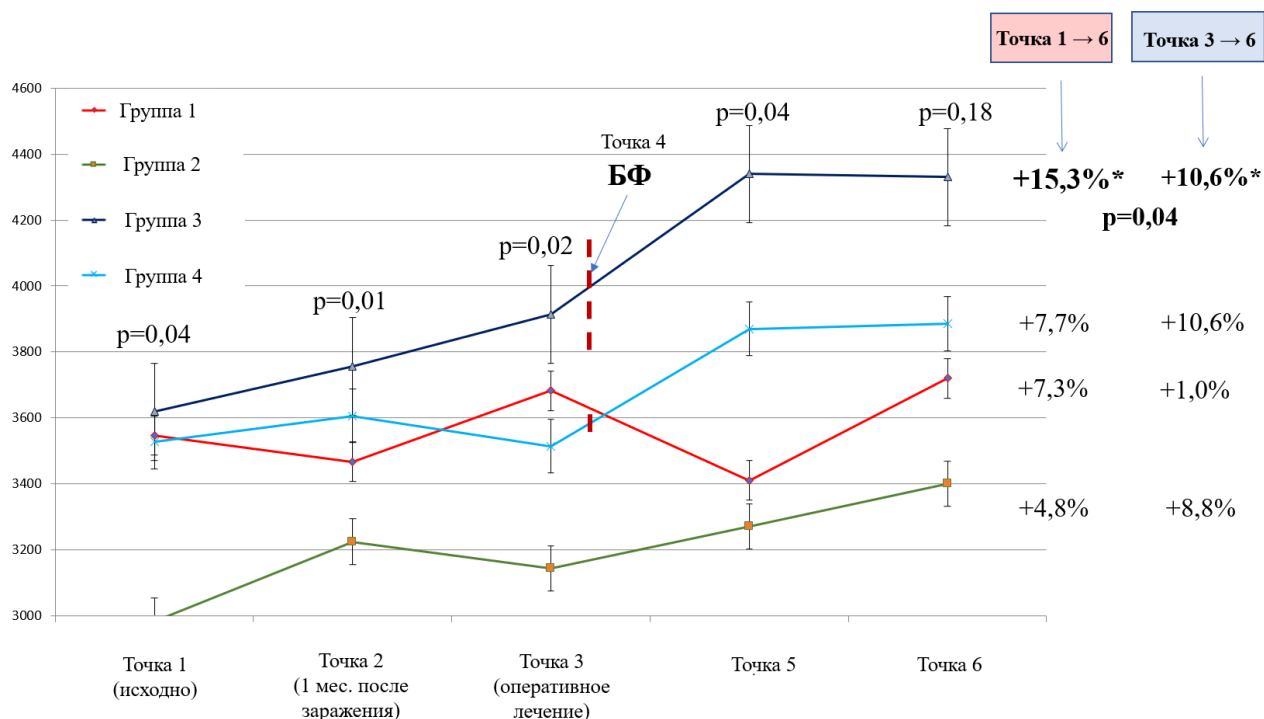


Рисунок 2 - Динамика массы тела кроликов на протяжении эксперимента

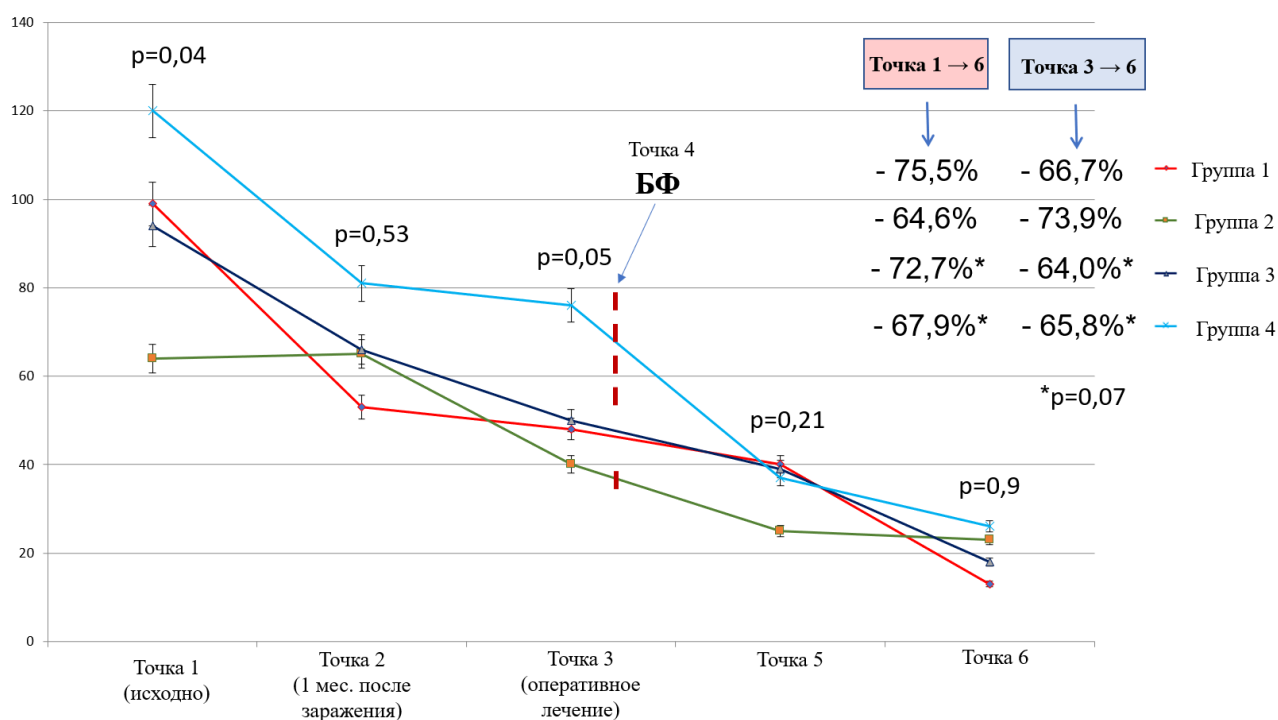


Рисунок 3 - Динамика уровня общей щелочной фосфатазы на протяжении эксперимента

Статистически достоверные различия по уровню склеростина в сыворотке крови между группами определяются при измерении на сроке 3 месяца ($p = 0,03$) (Рисунок 4). Для остальных показателей статистически значимые различия между группами и в динамике внутри групп отсутствуют, что может быть обусловлено, с одной стороны, высокой чувствительностью данных показателей к циркадным ритмам, режиму питания. При сопоставлении 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 [Dydykina, I. S., 2013].

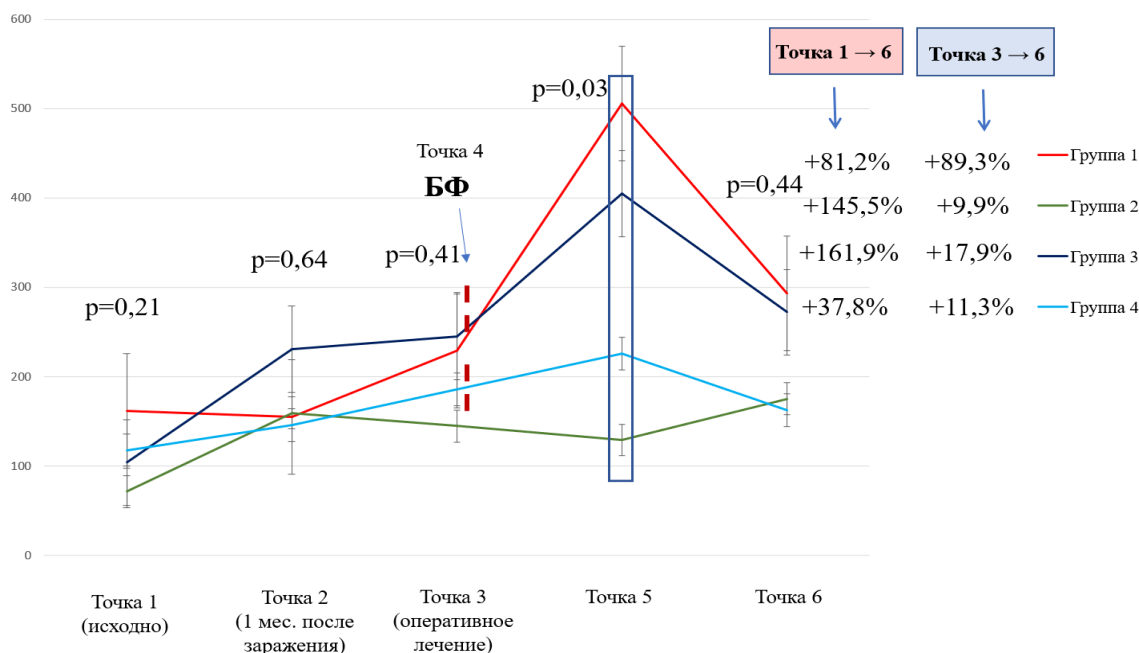


Рисунок 4 - Динамика уровня склеростина

Результаты лучевого исследования

Изучены компьютерные томограммы 11 левых интактных бедренных костей и 21 правой бедренной кости.

Анализ интактных (левых) бедренных костей позволил получить представление об особенностях архитектоники эпифиза бедренной кости кролика.

При анализе экспериментальных (правых) бедренных костей на фоне вариативности лучевых данных между группами и внутри них определяются следующие особенности:

в группе 1 - нарастание КТ-признаков остеодеструкции в динамике с максимальной выраженностью через 7,5 месяцев от момента инфицирования (Таблица 1, Рисунок 5);

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

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

для группы 4 характерно обнаружение имплантата и/или его фрагментов в 100% случаев на обоих сроках наблюдения с выраженным прорастанием костными балками (Рисунок 6). На сроке 3 месяца костные полости содержат неоднородное содержимое, костные фрагменты (секвестры), тогда как через 6 месяцев определяется невилирование данного признака.

Таблица 1 – Изменение лучевых признаков остеорегенерации и остеолитиза в ходе эксперимента

Группа	Период наблюдения, мес.	Признаки остеорегенерации (баллы 0-2, Me)							Признаки остеолитиза (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	

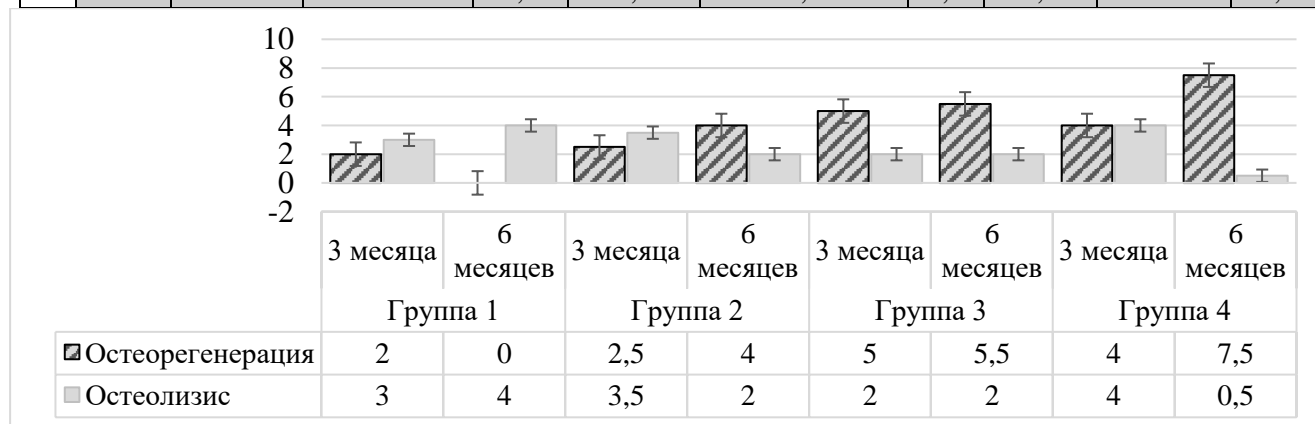


Рисунок 5 - Балльная оценка лучевых признаков остеорегенерации и остеолитиза, Me, сумма баллов

Отличительным признаком экспериментальных групп 3 и 4 является сохранение имплантата в 85,7 - 100% препаратов даже при наличии костных полостей, а также прорастание его костными балками, тогда как в группе 2 имплантат определяется в 50% препаратов только на первом сроке оценки и лишь в 25% случаев располагается в эпифизе.

При полуколичественной (в баллах от 0 до 2) оценке лучевых признаков остеорегенерации и остеолизиса во всех получавших лечение группах в динамике отмечается нарастание суммы баллов признаков, характеризующих остеорегенерацию. 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 остеорегенерации (7,5 баллов) и минимальные – остеолизиса (0,5 балла).

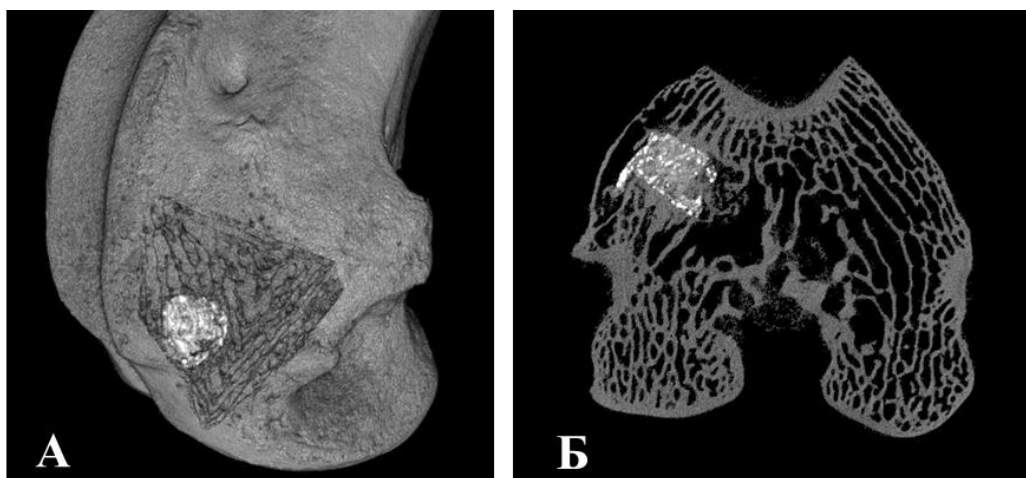


Рисунок 6 – КТ-изображение дистального отдела правой бедренной кости кролика группы 4 на сроке аутопсии 6 месяцев (А – 3D-реконструкция, Б – КТ-срез). Имплантат имеет неоднородную плотность, включения CaSO_4 , прорастает костными балками; периимплантной резорбции нет

Результаты морфологического и морфометрического исследования

В дистальных эпифизах интактных (левых) бедренных костей, аутопсированных через 6 месяцев (Рисунок 7), при относительно схожей макроскопической картине и общей костной плотности, определяется различное

соотношение толщины костных балок и остеформирующих клеточных элементов (Рисунок 8).

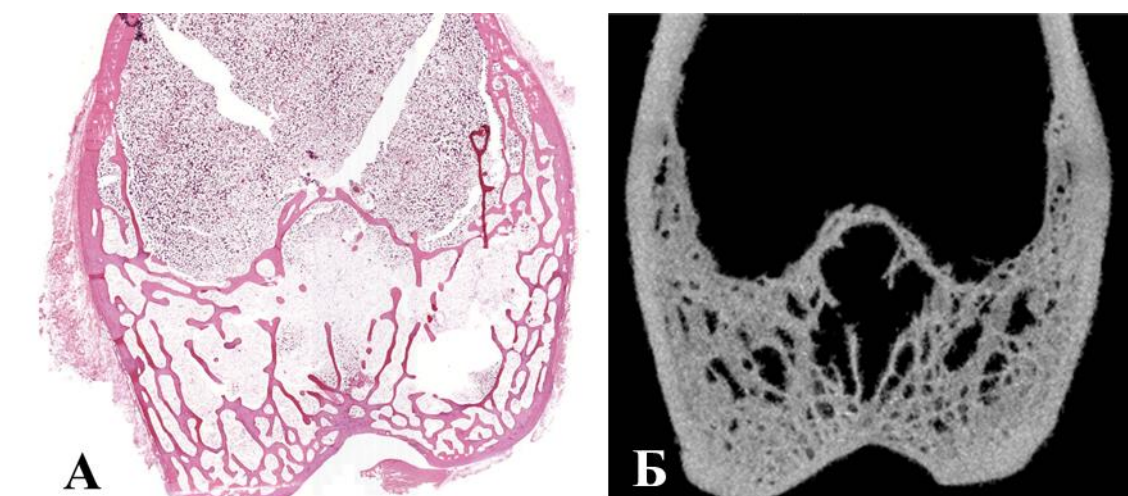


Рисунок 7 - Отсканированное изображение микропрепарата (А, окраска гематоксилином и эозином) и КТ-срез макропрепарата (Б) эпифиза левой (интактной) бедренной кости (препарат группы контроля заражения)

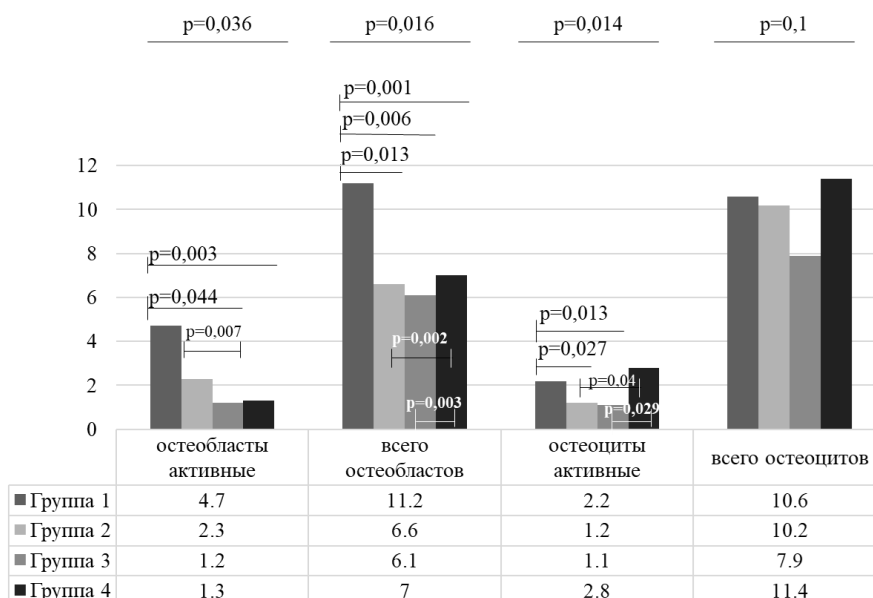


Рисунок 8 - Клеточный состав интактных препаратов левой бедренной кости (среднее значение (М) на 1 поле зрения, при увеличении x1000)

В препаратах правых бедренных костей **группы 1 (контроль заражения)** определяется нарушение гистоархитектоники эпифизарной зоны из-за ярко выраженного активного специфического воспаления с эпителиоидно-

макрофагальной инфильтрацией, занимающего более 40% площади среза кости (Рисунок 9); выявлены кислотоустойчивые микроорганизмы (КУМ) (Рисунок 10).

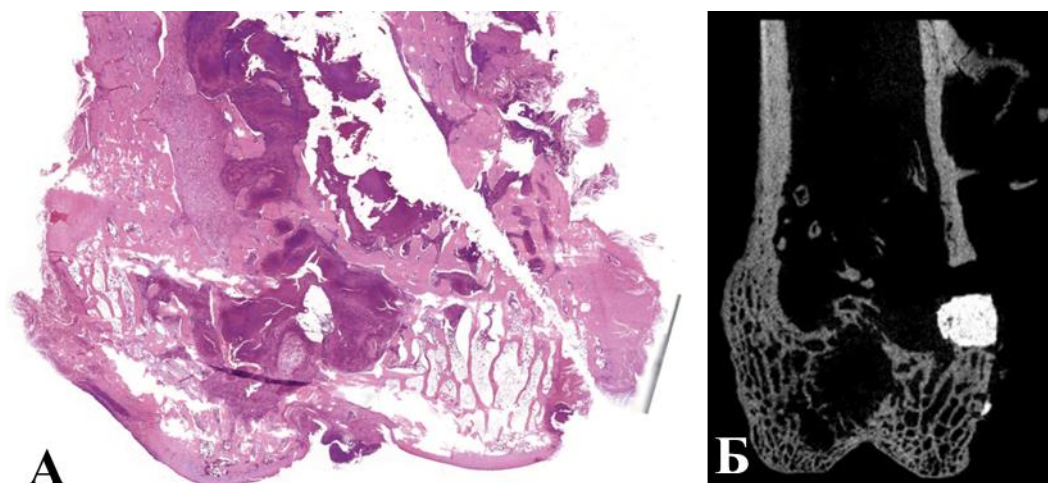


Рисунок 9 - Отсканированное изображение микропрепарата (А, окраска гематоксилином и эозином) и КТ-срез макропрепарата (Б) эпифиза правой бедренной кости (препарат группы контроля заражения, аутопсия в контрольной точке 3 месяца)

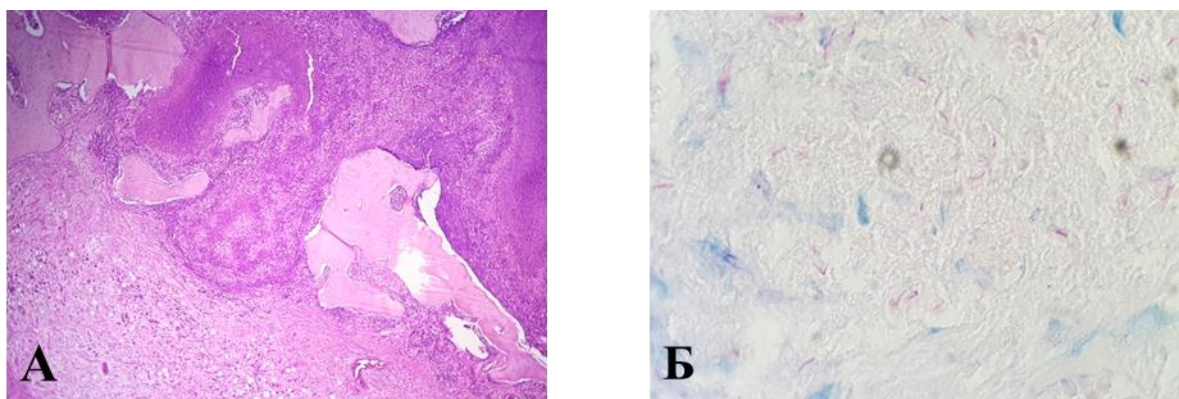


Рисунок 10 – Микрофотография очага воспаления в препарате группы 1 (контроль заражения): окраска гематоксилином и эозином (А, увеличение x100) - грануляционная ткань по периметру; окраска по Цилю - Нельсену (Б, увеличение x1000) - КУМ в очагах некроза

Определяется максимальная, в сравнении с другими группами, толщина костных балок на сроке 3 месяца ($p < 0,001$), на сроке 6 месяцев данный показатель остается выше показателя групп 2 и 3, но ниже, чем в группе 4.

В препаратах **группы 2** определяется различная гистологическая картина в зависимости от сроков наблюдения. Гистоархитектоника эпифиза через 3 месяца

нарушена ввиду наличия специфического воспаления, через 6 месяцев – практически восстановлена, специфическое воспаление определяется в одном препарате и занимает менее 1% площади эпифиза. Количество остеокластов в динамике нарастает (0,2 в поле зрения на препарат через 3 месяца, 0,3 – через 6 месяцев), чего не отмечается в других группах.

В препаратах **группы 3** на сроке 3 месяца гистоархитектоника эпифизарной зоны изменена из-за воспаления, балочная структура восстановлена, балки образуют толсто-петлистую равномерную сеть; на сроке 6 месяцев - сохранена, балочная структура восстановлена в 75% случаев. В эпифизе балки образуют равномерную тонко-петлистую (25% препаратов) либо толсто-петлистую сеть (50% препаратов). Очаги специфического воспаления выявлены в одном препарате на каждом сроке наблюдения, их площадь составляет 50% и 42% от площади препаратов, соответственно. В 75% образцов по КТ визуализируются гранулы имплантата в эпифизе и метаэпифизе, в гистологических препаратах определяется неспецифическое воспаление, представленное в основном лимфоплазмочитарной инфильтрацией (Рисунок 11). В эпифизарной 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 п/зр.), но на сроке 6 месяцев снижается до 0 клеток во всех полях зрения. На сроке 3 месяца в группе отмечаются максимальные значения толщины костных балок в сравнении с другими исследуемыми группами ($p < 0,001$), через 6 месяцев - толщина костных балок выше, чем контралатерально и в группе 2 ($p < 0,001$).

В препаратах **группы 4** гистоархитектоника эпифизарной зоны изменена из-за воспаления, балочная структура частично восстановлена, в эпифизе балки образуют петлистую сеть. Через 3 месяца в 2 из 3 препаратов в эпифизе визуализируются обширные очаги воспаления, занимающие от 28% до 48% площади, представленные специфическим воспалением с высокой текущей активностью и неспецифическим – в виде реакции на гранулы имплантата (Рисунок 12). На сроке 6 месяцев специфическое воспаление выявлено только в 1 из 4 препаратов, площадь его составила 17% от площади эпифиза. Отмечаются

признаки активного остеогенеза по всем оцениваемым параметрам - доли активных остеобластов/остеоцитов, площадь костной ткани, активный стромальный и сосудистый компонент. При этом число остеокластов в данной группе среди групп 2 – 4 является самым низким и не меняется в динамике (0,1 на препарат в п/зр.). На сроке наблюдения 6 месяцев в этой группе выявлены самые большие процентные значения площади костной ткани и толщины балок в эпифизе.

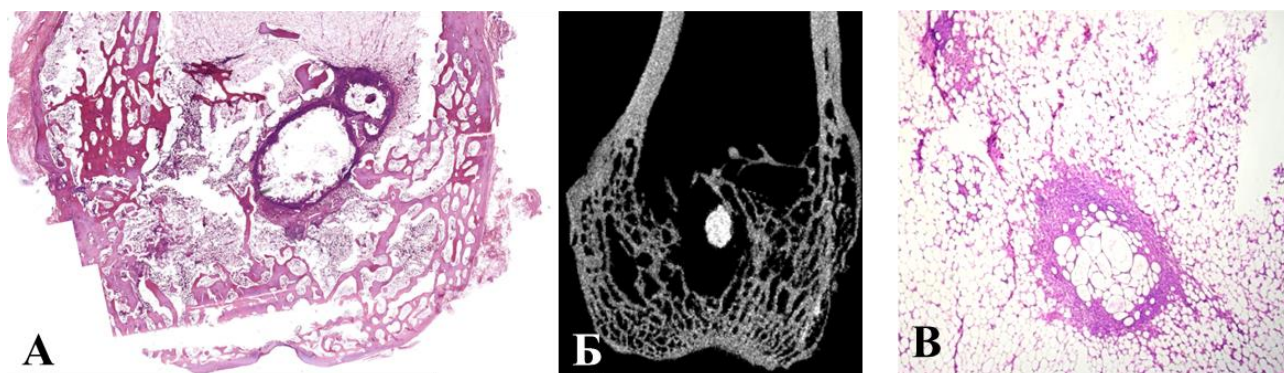


Рисунок 11 - Изображения эпифиза бедренной кости препаратов группы 3. А - Отсканированное изображение микропрепарата (окраска гематоксилином и эозином), аутопсия через 3 месяца после оперативного лечения; Б - КТ-срез того же макропрепарата; В – микрофотография гистопрепарата (окраска гематоксилином и эозином, увеличение x100), аутопсия через 6 месяцев, очаг неспецифического воспаления

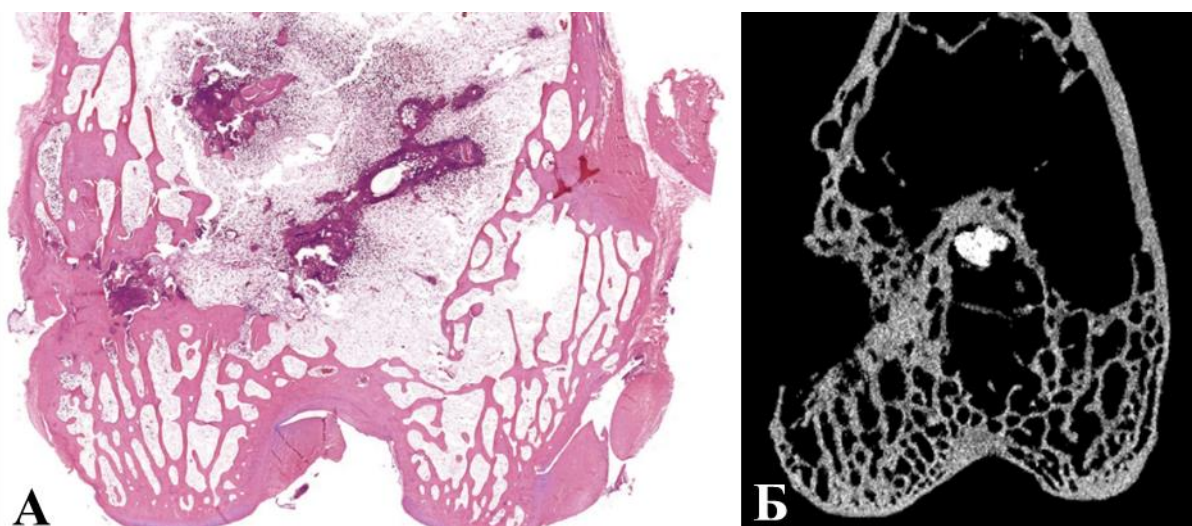


Рисунок 12 - Отсканированное изображение микропрепарата (А, окраска гематоксилином и эозином) и КТ-срез (Б) эпифиза бедренной кости препарата группы 4, аутопсия через 6 месяцев

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

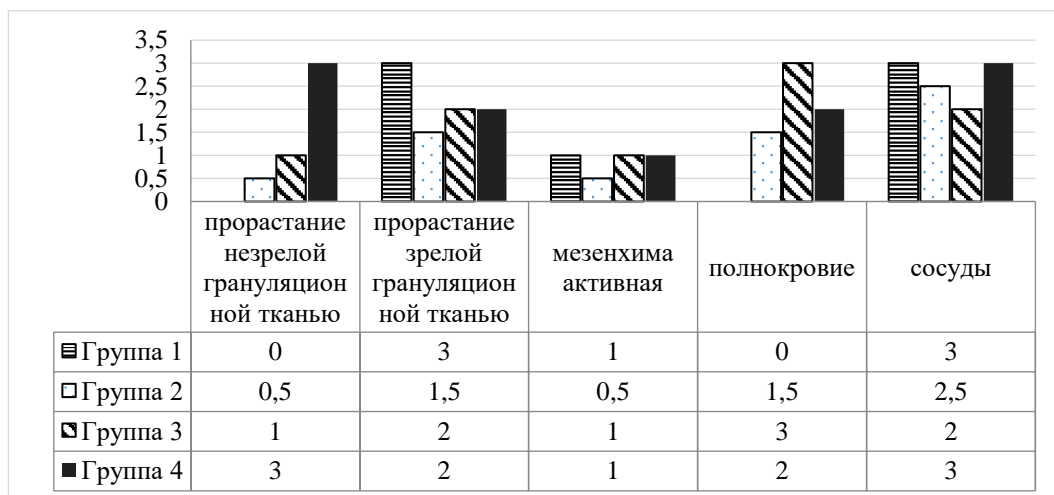
Анализ гистологических паттернов, отражающих активное ремоделирование костной ткани в зоне воспаления (Рисунок 13), демонстрирует на сроке 3 месяца в группах 3 и 4 большее количество грануляционной ткани, активной мезенхимы и полнокровных сосудов (оценка в баллах), на сроке 6 месяцев - наибольшее количество грануляционной ткани и полнокровных сосудов в группе 4.

Проведенные морфологические и морфометрические исследования показали:

- Модель туберкулезного остита бедренной кости во всех группах состоятельна, с максимальной выраженностью в группе 1 (контроль заражения) и нарастанием площади поражения к 6 месяцу.
- В группах 2 - 4 максимальные проявления специфического воспаления отмечаются на 3 месяце и занимают от 10% до 50% площади эпифиза. Кислотоустойчивые микроорганизмы обнаружены в большинстве очагов, при этом на фоне ПТТ, БФ и их комбинации отмечено нивелирование специфического воспаления к 6 мес. в 50-75% случаев.
- Неспецифическое воспаление на гранулы имплантата характеризуется перигранулярным инфильтратом лимфоплазмочитарного (иммунного) характера с реакциями рассасывания. Многочисленные растущие костные балки с признаками текущего остеогенеза подтверждают наличие остеомодуляции в зоне имплантата.
- Отличительным паттерном в группах назначения БФ (3 и 4) является формирование стромальных тяжей (прослоек) с увеличенным количеством сосудов по периферии воспалительных и деструктивных зон.
- Снижение числа остеокластов в динамике между 3 и 6 месяцами отмечается во всех исследуемых группах, кроме контроля заражения, при этом на сроке 3 мес. оно уже минимально в группах назначения БФ (3 и 4).

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

- В образцах контралатеральной стороны всех групп (1 – 4) при относительно схожей макроскопической картине и общей костной плотности определяется различное соотношение толщины костных балок и остеоформирующих клеточных элементов, что может свидетельствовать как о системном влиянии специфического воспалительного процесса, так и о медикаментозном воздействии на исходно интактную костную ткань.



А



Б

Рисунок 13 – Гистологические паттерны (оценка в баллах от 0 до 3), отражающие активное ремоделирование костной ткани в зоне воспаления. Сроки наблюдения: А – 3 месяца, Б - 6 месяцев

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: по одному препарату группы 2 (где площадь специфического воспаления составляет 1% от площади препарата) и группы 3 (где специфическое воспаление не выявлено).

При сопоставлении 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.

Среди исследуемых биохимических параметров статистически значимые соотношения с морфологическими данными определяются только для уровня склеростина, который коррелирует с числом остеоцитов, при этом максимальные значения выявлены в группах 1 и 3 (коэффициент Пирсона на сроке 3 месяца равен 1,0; 6 месяцев – 0,9).

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 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

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

изучение отдаленных результатов;

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

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

Ограничения достоверности результатов исследования

Ограниченное число наблюдений как общее ограничение экспериментов на животных.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и образования РФ и входящих в международные реферативные базы данных:

1. Морфометрические характеристики костной ткани в условиях лечения экспериментального туберкулезного остита противотуберкулезными препаратами и селективными ингибиторами остеокластов. / В. В. Петухова, А. Ю. Мушкин, М. М. Костик [и др.] // Медицинский альянс. – 2022. – Т. 11. – № 4. – С. 106 - 114 - DOI: 10.36422/23076348-2022-10-4-106-114.

2. Влияние однократного введения памидроната на интактную кость в условиях экспериментальной модели лечения туберкулезного остита. /В. В. Петухова, А. Ю. Мушкин, М. М. Костик [и др.] // Педиатр. – 2022. - Т. 13. - № 6. - С. 55-62. – DOI: 10.17816/PED13655-62.

3. Петухова, В. В. Влияет ли туберкулезный остит, противотуберкулезная терапия и бисфосфонаты на интактную контрлатеральную кость? (предварительные результаты экспериментального исследования)/ В.В. Петухова // Российский педиатрический журнал. – 2022. – Т. 25. - №6. – С. 426 - 427. - DOI: 10.46563/1560-9561-2022-25-6-381-450.

4. Применение бисфосфонатов при экспериментальном туберкулезном остите: КТ-визуализация. / В. В. Петухова, А. Ю. Мушкин, М. М. Костик [и др.] // Гений ортопедии. – 2023. – Т. 29. - №1. – С. 78-84. - DOI: 10.18019/1028-4427-2023-29-1.

Публикации в иных научных изданиях:

5. Петухова, В. В. Динамика биохимических маркеров остеогенеза при лечении экспериментального туберкулезного остита. / В.В. Петухова // IX Международный Молодежный Медицинский Конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения - 2022». Отв. ред. Н.А. Гавришева. – 2022. – С. 315-316.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В АВТОРЕФЕРАТЕ СОКРАЩЕНИЙ

БФ - бисфосфонаты

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

КТ – компьютерная томография

КУМ – кислотоустойчивые микроорганизмы

ПТТ – противотуберкулезная терапия

п/зр. - поля зрения