

© Коллектив авторов, 2017

БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОСТНОЗАМЕЩАЮЩИХ КОНСТРУКТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ 3D-ПЕЧАТИ ИЗ КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ ПОЛИМЕРОВ, ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ И ВАНКОМИЦИНА

П.А. Каралкин, Н.С. Сергеева, В.С. Комлев, И.К. Свиридова, В.А. Кирсанова, С.А. Ахмедова, Я.Д. Шанский, Е.А. Кувшинова, А.Ю. Федотов, А.Ю. Тетерина, С.М. Баринов, А.Д. Каприн

«Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» — филиал
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России;
ФГБУН «Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова» РАН;
ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Минздрава России, Москва, РФ

Введение. Локальная доставка терапевтических концентраций антимикробных препаратов в зону оперативного вмешательства при костных патологиях позволяет предотвратить или существенно замедлить развитие остеомиелита. В данной работе была исследована эффективность включения и высвобождения антибиотика ванкомицина из трехмерных конструкций на основе альгината натрия, желатина и октакальциевого фосфата, предназначенных для замещения костных дефектов.

Материалы и методы. Прототипирование трехмерных конструкций осуществляли методом экструзионной 3D-печати. Различные концентрации ванкомицина вносили в качестве дополнительного компонента на этапе приготовления гидрогелей («чернил») для печати. Физические испытания конструкций включали оценку их микроструктуры и пористости посредством электронной микроскопии, а также исследование механической прочности на сжатие и растяжение. Функциональную активность напечатанных конструкций в отношении тестового штамма *S. aureus* ATCC 6538-P оценивали *in vitro* диско-диффузионным методом и *in vivo* на модели зараженной эксцизионной раны на коже крысы.

Результаты. Анализ кинетических кривых показал, что основное высвобождение препарата в модельную жидкости происходило в течение первых суток. Общая масса связанного и вышедшего ванкомицина составляла приблизительно 20% от расчетного исходного количества для всех трех концентраций препарата. *In vitro* показано формирование выраженной зоны задержки роста штамма *S. aureus* в присутствии насыщенных ванкомицином конструкций. Внесение конструкций в область инфицированного кожного дефекта приводило к снижению выраженности и частоты развития воспалительных процессов и ускоряло сроки полного заживления ран.

Заключение. В ходе исследования была показана принципиальная возможность 3D-печати костнозамещающих имплантатов многокомпонентными гидрогелевыми композициями без изменения свойств отдельных составляющих.

Ключевые слова: 3D-печать, альгинат натрия, желатин, октакальциевый фосфат, остеопластические материалы, функционализация, ванкомицин.

Bacteriostatic Characteristics of Bone Substituting Constructors Obtained from Composite Materials Based on Natural Polymers, Calcium Phosphates and Vancomycin

P.A. Karalkin, N.S. Sergeeva, V.S. Komlev, I.K. Sviridova, V.A. Kirsanova, S.A. Akhmedova, Ya.D. Shanskiy, E.A. Kuvshinova, A.Yu. Fedotov, A.Yu. Teterina, S.M. Barinov, A.D. Kaprin

P.A. Herzen Moscow Oncology Research Institute; A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science; Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Introduction. The local delivery of therapeutic antibiotic concentrations to the zone of surgical intervention in bone pathology enables either to prevent or significantly decrease the rate of osteomyelitis development. In that study the efficacy of vancomycin inclusion and release from three dimensional constructors based on sodium alginate, gelatin and octacalcium phosphate and vancomycin intended for bone defect substitution was studied.

Materials and methods. Prototyping of 3D constructors was performed by extrusion 3D printing. Various concentrations of vancomycin were added as an additional component at the stage of preparation of hydrogel ("ink") for printing. Physical testing of the constructors included electron microscopic evaluation of their microstructure and porosity as well as the study of mechanical strength for compression and stretching. Functional activity of printed constructors with respect to the test strain *S. aureus* ATCC 6538-P was assessed by a disc-diffusion method *in vitro* and on the model of infected excision skin wound in rats - *in vivo*.

Results. Analysis of the kinetic curves showed that the principal release of the drug in the model liquid took place within the first day. The total volume of the bound and released vancomycin made up approximately 20% of the calculated initial amount for all three concentrations. Formation of the marked growth inhibition zone of *S. aureus* strain in presence of vancomycin rich constructors was demonstrated *in vitro*. Insertion of constructors into the zone of infected skin defect resulted in a decrease of inflammatory processes severity and rate as well as accelerated the terms of complete wound healing.

Conclusion. Study results showed the principle potentiality of bone substituting implants 3D-printing using multicomponent hydrogel compositions without change of separate components characteristics.

Key words: 3D-printing, sodium alginate, gelatin, octacalcium phosphate, osteoplastic material, functionalization, vancomycin.

Введение. Лечение гнойно-некротических воспалительных процессов (остеомиелитов), развивающихся в костях и костном мозге в присутствии пиогенной флоры, а также микобактерий, является актуальной и во многом нерешенной проблемой современной травматологии и ортопедии. Известно, что при ряде патологических состояний на фоне общего снижения иммунитета, травм, хирургических вмешательств или имплантаций искусственных эндопротезов происходит нарушение целостности защитных барьеров костной ткани, приводящее к гематогенному или первичному проникновению внутрь костей бактерий с последующим развитием инфекционных процессов [1, 2]. В частности, остеомиелит является нередким осложнением реконструктивных операций у пациентов с опухолевыми и метастатическими поражениями костей [3, 4].

В 90% случаев в роли возбудителя инфекционных процессов в костях выступает *Staphylococcus aureus*, реже — *Streptococcus pyogenes* (4%), *Haemophilus influenzae* (4%), *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* и микроорганизмы родов *Salmonella* и *Brucella* [5–7]. При этом лечение больных остеомиелитом в значительной степени осложнено низкой биодоступностью формирующихся очагов остеонекроза и секвестров для антимикробных препаратов при их системном введении, и, как следствие, быстрым развитием резистентности возбудителей инфекции. С этих позиций локальная доставка терапевтических концентраций антибиотиков в зону оперативного вмешательства у больных из группы высокого риска позволяет предотвратить или существенно замедлить развитие инфекционных осложнений [8].

Накопленный к настоящему времени богатый опыт использования костнозамещающих кальцийфосфатных материалов свидетельствует в пользу их хорошей биосовместимости и выраженных osteoconductive свойств [9]. В то же время разработка композиционных материалов на основе фосфатов кальция с добавлением натуральных (полисахаридов и белков) или синтетических органических компонентов перспективна с точки зрения получения нового поколения костнозамещающих имплантатов, демонстрирующих лучшие показатели пористости, механической прочности и контролируемой скорости биорезорбции [10].

В последние годы активно разрабатываются методы прототипирования и в частности, 3D-печати, направленные на изготовление персонализированных костных имплантатов с заданной конфигурацией. Ранее нами была показана принципиальная возможность симбатного прототипирования полимерного каркаса и кальцийфосфатных армирующих фаз [11]. Кроме того, в качестве наиболее подходящего для 3D-печати кальцийфосфатного материала был выбран синтетический октакальциевый фосфат, являющийся возможным предшественником биологического апатита кости и демонстрирующий наилучшие показатели биосовместимости *in vitro* и *in vivo* в сравнении с трикальциевым фосфатом и карбонатзамещенным гидроксипатитом [12, 13].

С другой стороны, существует возможность придания напечатанным имплантатам на основе биорезорбируемых компонентов дополнительных полезных свойств посредством их функционализации биологически активными или лекарственными веществами, в том числе антибиотиками. Например, было показано, что сформированные трехмерные конструкты можно насыщать антимикробными препаратами на разных этапах их получения: как перед началом 3D-печати, на этапе смешивания сухих компонентов и приготовления «чернил» для печати [14], так и после ее завершения — путем инфльтрации готовых имплантатов антибиотиками [15] или их биомиметического осаждения совместно с фосфатами кальция на активированную органическими кислотами поверхность конструктов для получения микроразмерного покрытия [16]. При этом во многих экспериментальных исследованиях для функционализации имплантатов для остеопластики используют антибиотик ванкомицин, активный в отношении ряда штаммов *S. aureus* — основного возбудителя инфекционного остеомиелита [17, 18]. Тем не менее, несмотря на очевидные перспективы, исследования в этом направлении находятся в начальной стадии, поэтому в настоящий момент не представляется возможным заранее предсказать, какой из методов обеспечит достаточное связывание антибиотика с конструктом и подходящую скорость его высвобождения из конструкта для обеспечения пролонгированного фармакологического эффекта.

Целью настоящей работы было изучение связывания, динамики высвобождения и антибактериальных свойств ванкомицина при его включении в состав гидрогеля для 3D-печати конструктов, предназначенных для замещения костных дефектов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Прототипирование образцов трехмерных конструктов (ТК) и исследование физико-химических характеристик получаемых конструктов состава альгинат-желатин-октакальциевый фосфат проводилось по схеме, описанной нами ранее [11, 13]. В качестве «чернил» для печати использовали композиционный гидрогель на основе 2% раствора альгината натрия (Альг) («Acros», Германия), 10% водного раствора желатина (Жел) (Gelatine 80-100, «Sigma-Aldrich», США) и гранул октакальциевого фосфата (ОКФ) диаметром 100–200 мкм. Гранулированный ОКФ получали методом двухстадийного химического синтеза из карбоната кальция (CaCO_3) как описано ранее [12].

3D-печать экспериментальных образцов осуществляли при помощи оригинальной установки для струйной печати ИППЛИТ 50/01 (разработка ФГБУН ИППЛИТ РАН) на основе предварительно созданной цифровой модели в формате STL. По завершении процесса печати трехмерные конструкты помещали в морозильную камеру (-50°C), после чего подвергали сублимационной сушке и затем обрабатывали сшивающим агентом — 10% водно-спиртовым раствором хлорида кальция (CaCl_2). Образцы «сшитых» ТК помещали в термостат (37°C) до полного высыхания. Состав исходных композиционных ТК включал 56 масс. % Альг, 14 масс. % Жел и 30 масс. % ОКФ.

Функционализацию композиционного материала Альг-Жел-ОКФ осуществляли антибиотиком ванкомицин («Teva Pvt. Ltd», Венгрия) посредством его введения в состав гидрогеля в процессе изготовления. Для этого ванкомицин в сухом виде вводили в состав композита на этапе растворения органических компонентов и приготовления чернил для печати с содержанием антибиотика в сухом веществе материала 30, 50 и 70 масс. %. После формирования функционализированных ТК их помещали в морозильную камеру при температуре -47°C на 24 ч. Далее образцы подвергались лиофилизации в течение 1 сут.

Исследовали микроструктуру ТК на сканирующем электронном микроскопе Vega II SBU («Tescan», Чехия) и их прочностные характеристики (прочность на сжатие, растяжение) на электродинамической испытательной системе ElectroPuls E3000 («Instron», США).

Динамику выхода ванкомицина из функционализированных ТК в течение 25 сут исследовали при их выдерживании в фосфатно-солевом буфере (PBS, «ПанЭко», Россия) при 37°C и постоянном перемешивании. Три одинаковых ТК помещали в 1 мл модельной жидкости и в установленные сро-

ки (30, 60, 90, 120, 150, 180 мин, 6 ч, и далее каждые 1–3 сут) осуществляли забор образцов жидкости для измерения выхода препарата с последующим добавлением новой порции того же объема. Концентрацию ванкомицина (молярная масса 1480 Да, $\epsilon=4,084 \text{ л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$) в пробах оценивали методом УФ-спектроскопии при длине волны 280 нм на бесцветном спектрофотометре NanoDrop-2000 («ThermoFisher Scientific», США) [19].

Стерилизацию образцов для изучения их биосовместимости осуществляли γ -облучением (15 кГр). Для изучения бактериостатического/бактерицидного действия ТК в модельных экспериментах *in vitro* и *in vivo* был выбран штамм *S. aureus* 6538-P из американской коллекции типовых культур (ATCC). Концентрацию бактерий доводили до $1,5\cdot 10^8$ КОЕ в 1 мл, используя стандартный образец мутности 10 ЕД СОС 42-28-59-85. Для экспериментов использовали чистую суточную культуру в концентрации $1,5\cdot 10^8$ КОЕ/мл, выросшую на плотной питательной среде TSA (триптон-сосевый агар).

Антибактериальную активность функционализированных ТК в отношении *S. aureus* определяли диско-диффузионным методом по выходу ванкомицина из образцов в среду TSA с нанесенной суспензией микроорганизмов [20]. Контролем служили ТК без препарата. Учет результатов антимикробной активности ванкомицина в ТК проводили через 24 ч путем измерения размеров зоны задержки роста тест-штамма *S. aureus* от края образца до границы роста микроорганизмов.

Исследования *in vivo* бактериостатического/бактерицидного действия ТК на основе Альг-Жел-ОКФ, насыщенных ванкомицином, проводили на модели эксцизионной инфицированной раны на коже половозрелых аутбредных крыс (самок). Для этого было сформировано 4 группы животных (по 5 особей в каждой): 1-я группа (отрицательный контроль) — неинфицированные раны, без лечения; 2-я группа (положительный контроль) — инфицированные раны без лечения; 3-я и 4-я группа — инфицированные раны с внесенными ТК, функционализированными ванкомицином с содержанием антибиотика в сухом веществе 30 и 70 масс. % соответственно.

Все эксперименты с мелкими лабораторными животными проводили с соблюдением принципов гуманности в соответствии с Директивами Совета Европейского Сообщества 2010/63/EU «Об использовании животных для экспериментальных исследований». Для анестезии использовали золетил 100 («Вирбак», Франция), который вводили внутримышечно в дозе 15 мг/кг. Затем в области лопаток на коже формировали полнослойные раны размером 20×20 мм. Полученные раны инфицировали *S. aureus* в дозе $1,5\cdot 10^8$ КОЕ/мл на раневую поверхность, затем в рану закладывали тестируемые ТК и накладывали хирургические швы. Все манипуляции осуществляли с соблюдением правил асептики. Антимикробный потенциал функционализированных ТК оценивали по следующим крите-

риям: общее состояние животных и поведенческие реакции, местная воспалительная реакция, сроки заживления ран.

Животных выводили из эксперимента на 15-е сутки после формирования дефектов методом декантации с предварительной общей анестезией. Производили забор тканей из области раневого дефекта с прилегающей кожей и подлежащими мышцами. Ткани фиксировали в 10% нейтральном формалине, далее изготавливали парафиновые блоки и окрашенные гематоксилином и эозином срезы. Анализ и получение цифровых изображений гистологических препаратов осуществляли при помощи микроскопа Eclipse Ti («Nikon», Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Методом струйной 3D-печати были получены ТК для замещения костных дефектов состава Альг-Жел-ОКФ. Изделия имели форму цилиндров диаметром 4,0–4,5 мм, высотой 3–4 мм и массой 3,5–4,4 мг. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) показала, что органическая составляющая ТК имеет пористую структуру, в которую «вкраплены» гранулы ОКФ (рис. 1, а). Обшая пористость напечатанного материала находилась в пределах 60–80 % со средними размерами пор порядка 50–60 мкм. Введение в состав гидрогеля 30 масс. % ванкомицина не влияло на структуру образца. Согласно данным СЭМ при увеличении концентрации антибиотика в гидрогеле до 50 масс. % микроструктура ТК претерпевала небольшие изменения. Средний размер пор возрастал до 200–230 мкм, а на поверхности образцов формировался слой ванкомицина толщиной до 20 мкм (рис. 1, б). С увеличением концентрации антибиотика в гидрогеле распределение новообразованного слоя становилось более однородным, а его толщина увеличивалась.

Прочность при сжатии образцов на основе гидрогеля с антибактериальным препаратом уменьшалась с ростом концентрации лекарственного препарата в гидрогеле. Так, у ТК с исходным содержанием ванкомицина 30 масс. % показатели прочности на сжатие не отличались от таковых у исходных образцов (без препарата) и составляли в среднем 5,5 МПа. При повышении содержания ванкомицина до 50 и 70 масс. % прочность снижалась до 4,4 и 3,7 МПа соответственно.

Кинетику высвобождения ванкомицина из функционализированных ТК исследовали путем измерения его свободной концентрации в модельной жидкости. Анализ кинетических кривых показал, что вне зависимости от начальной концентрации основная часть препарата высвобождалась в течение первых 6 ч, после чего скорость его выхода заметно снижалась, и после первых суток дальнейшего увеличения свободной концентрации препарата в растворе практически не наблюдалось (рис. 2). Общий выход антибиотика из ТК за весь период инкубации составлял 0,069 мг для 30 масс. % ванкомицина, 0,110 мг для 50 масс. %

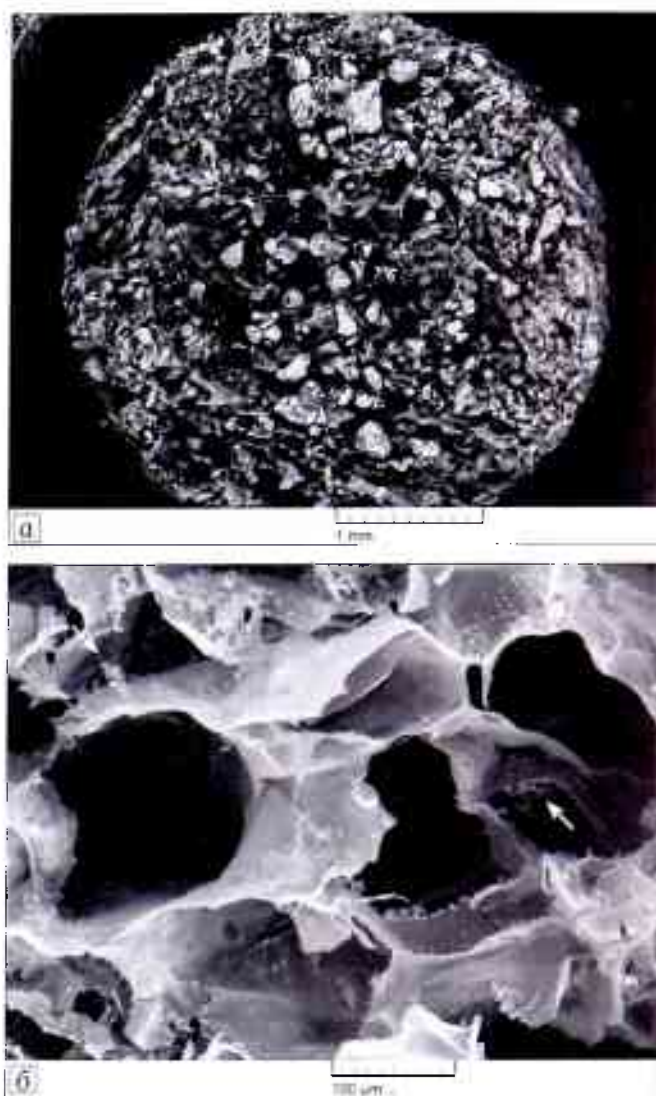


Рис. 1. Микроструктура поверхности композиционных ТК состава Альг-Жел-ОКФ. СЭМ.

а — исходный ТК, х 60; б — ТК с добавлением 50 масс. % ванкомицина в чернила для печати, х 600. Стрелками обозначены кристаллы ванкомицина.

и 0,127 мг для 70 масс. %. Поскольку за время эксперимента (25 сут) органическая составляющая образцов ТК полностью растворялась, то можно

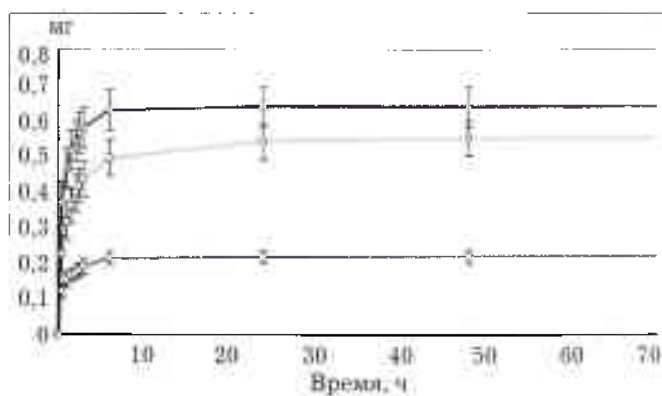


Рис. 2. Динамика выхода ванкомицина, введенного в трех разных концентрациях на этапе приготовления чернил для 3D-печати, из расчета на 1 мг сухого вещества ТК.

Содержание ванкомицина: —○— 30 масс. %, —□— 50 масс. %, —△— 70 масс. %.

Табл. 1. Соотношение введенного/вышедшего ванкомицина из материала ТК

Исходная доля ванкомицина в сухом веществе ТК, масс. %	Расчетное количество ванкомицина на 1 мг ТК, мг	Общее количество ванкомицина, вышедшего из 1 мг ТК, мг	Доля вышедшего ванкомицина по отношению к расчетному содержанию, %
30	0,3	0,069	23
50	0,5	0,110	22
70	0,7	0,127	18

было считать, что масса вышедшего ванкомицина соответствовала массе связанного с ТК препарата и составляла приблизительно 20% от расчетного количества для всех трех исходных концентраций (табл. 1). По всей видимости, оставшая часть вносенного препарата «терялась» на разных этапах изготовления ТК, в том числе при сшивании альгинатной матрицы в водно-спиртовом растворе CaCl_2 и при последующей многократной отмывке в дистиллированной воде.

При исследовании антимикробной активности ТК с ванкомицином *in vitro* оценивали линейные размеры зоны подавления роста *S. aureus* штамма ATCC 6538-R на плотной питательной среде. Четкий край зоны подавления роста и ее диаметр ≥ 12 мм свидетельствовали о чувствительности бактерий к антибиотику, в то время как нечеткий край или рост изолированных колоний внутри зоны указывали на резистентность.

Согласно полученным данным, исходные ТК на основе Алыг-Жел-ОКФ не обладали самостоятельной антимикробной активностью. В то же время наличие в составе ванкомицина приводило к формированию выраженной зоны подавления роста бактерий вокруг ТК, средний диаметр которой для 30 масс. % ванкомицина составил $16,2 \pm 0,2$ мм, для 50 масс. % — $15,4 \pm 0,4$ мм, для 70 масс. % — $17,4 \pm 0,3$ мм ($p > 0,05$), т. е. все три использованные концентрации ванкомицина демонстрировали хороший антимикробный эффект в отношении тестового штамма *S. aureus*.

Исследование бактериостатических свойств *in vivo* проводили на модели экцизионных ран на коже крыс. Во всех группах, за исключением 2-й группы (инфицированные раны с нефункционализированными ТК), животные выглядели здоровыми, охотно поедали корм, были подвижны, имели густой шерстный покров белого цвета, который

плотно прилегал к поверхности тела. Мышечный тонус, рефлекс, частота мочеиспускания, цвет мочи, количество и консистенция фекальных масс, зоосоциальное поведение животных соответствовали физиологической норме. У крыс 2-й группы в течение первых 4 суток после инфицирования наблюдались признаки интоксикации: адинамия, жажда, плохой аппетит.

Полученные данные свидетельствовали о наличии значительных различий как в характере, так и в динамике заживления ран в разных группах животных. Это выражалось и в существенной разнице в сроках полного заживления ран (табл. 2). Так, в 1-й группе (отрицательный контроль) неинфицированные раны заживали первичным натяжением, причем их закрытие наблюдалось с 8-х по 12-е сутки (рис. 3, а). У животных 2-й группы (положительный контроль) констатировали образование гнойных инфильтратов, расхождение швов; начальные признаки заживления ран появлялись у отдельных животных лишь к 14-м суткам, а к 15-м суткам раны зажили не у всех крыс (рис. 3, б).

В обеих опытных группах животных (ТК с содержанием ванкомицина 30 и 70 масс. %) в сравнении со 2-й группой снижалась степень выраженности и частота воспалительных процессов в ранней (3-7 сут) послеоперационный период: лишь у 3 из 10 крыс в этих двух группах визуализировались гнойные инфильтраты. Кроме того, в этих группах наблюдалось более раннее (в сравнении со 2-й группой) очищение ран (рис. 3, в). Наличие в инфицированных ранах ТК, функционализированных ванкомицином, сокращало и общие сроки заживления ран (4 из 10 животных — уже к 12-м суткам). Значимых различий в заживлении ран в присутствии ТК с разными концентрациями ванкомицина не выявлено.

При анализе гистологических препаратов участков кожи крыс (15-е сутки после формирования раны) в 1-й группе были хорошо видны результаты активных процессов регенерации всех слоев кожи, признаки отека отсутствовали (рис. 4, а). В этой группе наблюдалась полная эпителизация раневой поверхности с формированием более сглаженного эпителиального края (в сравнении с интактной кожей). Дерма была представлена зрелой, хорошо васкуляризированной соединительной тканью.

Табл. 2. Влияние ТК, функционализированных ванкомицином, на динамику заживления инфицированных *S. aureus* ран у крыс

Группа животных	Число случаев полного закрытия раны в группе				Сроки полного заживления ран у всех животных в группе
	8 сут	12 сут	14 сут	15 сут	
1-я группа (отрицательный контроль)	3/5	5/5	5/5	5/5	12 сут
2-я группа (положительный контроль)	0/5	0/5	2/5	3/5	>15 сут
3-я группа (ТК+30 масс.% ванкомицина)	0/5	2/5	4/5	5/5	15 сут
4-я группа (ТК+70 масс.% ванкомицина)	0/5	2/5	3/5	5/5	15 сут



Рис. 3. Вид кожных покровов у крыс с модельными инфицированными кожными ранами на 7-е сутки после формирования дефекта в 1-й (отрицательный контроль, а), 2-й (положительный контроль, б) и 3-й (в) группе.

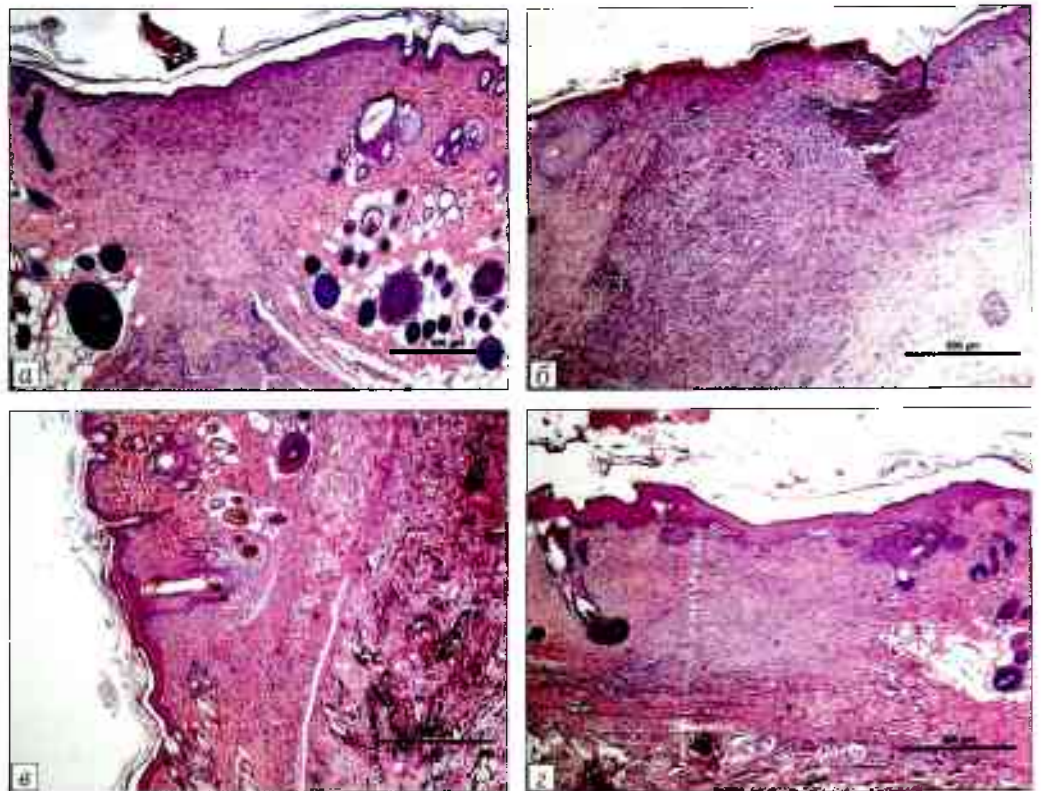


Рис. 4. Морфология кожных покровов и подлежащих мягких тканей в присутствии различных ТК через 15 сут после формирования эксцизионных инфицированных ран у крыс 1-й (а), 2-й (б), 3-й (в) и 4-й (г) группы. Окраска гематоксилином и эозином. х 40.

Во 2-й группе (рис. 4, б) также выявлена полная эпителизация поверхности раны. Однако раневой процесс здесь развивался по некротическому и дегенеративно-воспалительному типу: новообразованная дерма представлена соединительной тканью с выраженной диффузной лимфоидной инфильтрацией и интерстициальным отеком. В отдельных случаях гнойный экссудат распространялся диффузно в дерме и подкожной клетчатке вплоть до подлежащих мышечных структур — миосимпласов с образованием полиморфноклеточных инфильтратов.

В гистологических препаратах из операционной зоны животных 3-й группы также визуализи-

ровались признаки эпителизации раны (рис. 4, в). Дерма была выполнена зрелой васкулязированной соединительной тканью с гладкомышечными волокнами, признаки воспаления отсутствовали. В подкожно-жировой клетчатке определялся имплантат, пространства между слоями полимерного компонента которого были заполнены соединительной тканью.

Гистологические препараты животных 4-й группы в целом были идентичны таковым для животных 3-й группы (рис. 4, г).

Таким образом, репаративный гистогенез в зоне инфицированной раны в присутствии насыщенных ванкомицином конструкторов завершился в большей

степени и физиологически более адекватно к 15-м суткам после формирования дефекта, что косвенно подтверждало терапевтический эффект функционализированных антибиотиком ТК.

ОБСУЖДЕНИЕ

Технологические подходы к созданию персонализированных имплантатов нового поколения с использованием метода 3D-печати находят все большее применение в биомедицинских исследованиях. Использование напечатанных по индивидуальным цифровым моделям трехмерных конструктов для замещения сложных дефектов костей черепа при операциях в челюстно-лицевой хирургии и стоматологии уже сегодня позволяет сократить время хирургического вмешательства, ускорить приживание имплантатов, снизить частоту нежелательных побочных реакций, а также существенно улучшить косметический эффект лечения [21].

Одним из ключевых этапов 3D-печати имплантатов, предназначенных для постоянного замещения костных дефектов, является выбор остеопластических материалов, обладающих оптимальными параметрами остеокондукции и биорезорбции. Разработанные в последние десятилетия методы химического синтеза различных кальций-фосфатных соединений — карбонатзамещенного гидроксипатита, α - и β -трикальцийфосфата и др. — позволяют получать керамические материалы, близкие по составу к биологическому гидроксипатиту натуральной кости. В настоящей работе мы использовали октакальциевый фосфат, обладающий относительно высокой растворимостью в жидкостях организма и усиливающий процесс биоминерализации формирующейся костной ткани [22]. В то же время недостатками всех кальцийфосфатных материалов являются невысокие показатели их механической прочности и пористости, исключаяющие формирование на их основе крупных имплантатов для замещения критических дефектов. Кроме того, скорость биорезорбции таких имплантатов значительно ниже скорости неоостеогенеза, что приводит к замуровыванию остатков материалов и образованию микрополостей вследствие последующей пассивной резорбции и, в конечном итоге, снижает прочность новообразованной кости [23]. Добавление к кальцийфосфатным керамическим гранулам природных полимеров (например, коллагена, хитозана, желатина и др.) способствует улучшению механических свойств имплантатов и формированию в них крупных взаимосвязанных пор, обеспечивающих миграцию и заселение клетками остеобластического ряда, прорастание сосудов, перенос питательных веществ и выведение продуктов обмена. Применение подобных многокомпонентных, в частности минералполимерных, композитных материалов, базируется на фундаментальных представлениях о структуре межклеточного вещества костной ткани, представляющего собой композит из коллагеновых фибрилл и биологического апатита [24, 25]. С технологической точ-

ки зрения добавление органической компоненты (альгинаты, желатин и др.) обеспечивает дополнительные преимущества, поскольку позволяет контролировать требуемые параметры текучести и вязкости гидрогеля, используемого в качестве «чернил» для экструзионной 3D-печати.

Сочетание 3D-печати с адресной доставкой лекарственных средств (гормонов, противовоспалительных средств, анальгезирующих препаратов, антибиотиков, цитостатиков и генетических конструкций) является новым направлением медицинских аддитивных технологий, способным в значительной степени повысить терапевтический потенциал создаваемых индивидуальных имплантатов. Важными аспектами подобных подходов являются количество препарата, которое может быть включено в структуру имплантата, и сохранение его активности по окончании всех технологических этапов производства.

В настоящей работе мы исследовали возможность получения полимерно-керамических конструктов, функционализированных ванкомицином, предназначенных для лечения и профилактики остеомиелита — широко распространенного инфекционного поражения костной ткани. Несмотря на то что «золотым стандартом» для адресной доставки антимикробных препаратов являются костные цементы на основе полиметилметакрилата (РММА), многочисленные ограничения данного материала, такие как неспособность связывания большинства антибиотиков, короткий период высвобождения препаратов и необходимость повторных операций для удаления небиodeградируемого цемента, обуславливают поиск новых композиционных материалов-носителей, в том числе содержащих кальцийфосфатную керамику [26]. Подобный подход был недавно использован в работе коллектива исследователей, получивших методом 3D-печати насыщенные рифампицином и ванкомицином кальцийфосфатные скаффолды и убедительно доказавших их преимущества над аналогичными РММА-скаффолдами в модели остеомиелита *in vivo* [14]. Кинетика выхода препаратов, как и в нашей работе, соответствовала выходу основного количества антибиотиков в первые часы после помещения в модельную систему, при этом бактериостатический эффект конструктов на основе фосфатов кальция в области инфицированных костных дефектов у мышей сохранялся в течение 3 нед после имплантации.

Заключение. В ходе настоящего исследования была показана возможность получения функционально-ориентированных полимерно-керамических конструктов с заданным содержанием антимикробного препарата и его контролируемой кинетикой высвобождения. Кроме того, доказана принципиальная возможность 3D-печати костнозамещающих имплантатов многокомпонентными гидрогелиевыми композициями без изменения свойств отдельных составляющих. Проведение дальнейших исследований на моделях острого и

хронического остеомиелита у животных [27] позво-лит подробно изучить остеопластические свойства и бактериостатические эффекты функционализи-рованных композиционных материалов, что, несо-мненно, приблизит момент внедрения получаемых на их основе персонализированных имплантатов в повседневную клиническую практику.

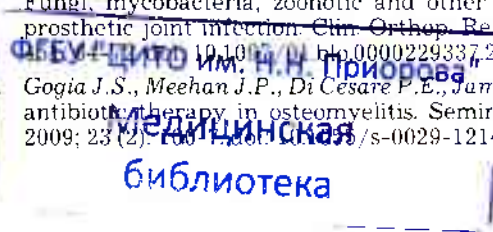
Работа выполнена при финансовой поддержке гранта
Министерства образования и науки
(соглашение № 14.604.21.0132 от 21 октября 2014 г.
ID: RFMEFI60414X0132).

ЛИТЕРАТУРА

- Lew D.P., Waldvogel F.A. Osteomyelitis. *Lancet*. 2004; 364 (9431): 369-79. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16727-5.
- Jorge L.S., Chueire A.G., Rossit A.R. Osteomyelitis: a current challenge. *Braz. J. Infect. Dis.* 2010; 14 (3): 310-5.
- Treaba D., Assad L., Govil H. et al. Diagnostic role of fine-needle aspiration of bone lesions in patients with a previous history of malignancy. *Diagn. Cytopathol.* 2002; 26 (6): 380-3. doi: 10.1002/dc.10120.
- Seng P., Alliez A., Honnorat E. et al. Osteomyelitis of sternum and rib after breast prosthesis implantation. *IDCases*. 2014; 2 (1): 31-3. doi: 10.1016/j.idcr.2014.12.004.
- Olson M.E., Horswill A.R. Staphylococcus aureus osteomyelitis: bad to the bone. *Cell Host Microbe*. 2013; 13 (6): 629-31. doi: 10.1016/j.chom.2013.05.015.
- Trampuz A., Widmer A.F. Infections associated with orthopedic implants. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2006; 19 (4): 349-56. doi: 10.1097/01.qco.0000235161.85925.e8.
- Marculescu C.E., Berbari E.F., Cockerill F.R., Osmon D.R. Fungi, mycobacteria, zoonotic and other organisms in prosthetic joint infection. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2006; 451: 64-72. doi: 10.1097/01.blo.0000229337.21653.f2.
- Gogia J.S., Meehan J.P., Di Cesare P.E., Jamali A.A. Local antibiotic therapy in osteomyelitis. *Semin. Plast. Surg.* 2009; 23 (2): 100-7. doi: 10.1055/s-0029-1214162.
- Панкратов А.С., Лекишвили М.В., Копецкий И.С. Костная пластика в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. Остеопластические материалы. М.: БИНОМ; 2011: 120-38.
- Pertici G., Carinci F., Carusi G. et al. Composite polymer-coated mineral scaffolds for bone regeneration: from material characterization to human studies. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. 2015; 29 (3 Suppl. 1): 136-48.
- Сергеева Н.С., Комлев В.С., Свиридова И.К. и др. Некоторые физико-химические и биологические характеристики трехмерных конструкций на основе альгината натрия и фосфатов кальция, полученных методом 3D-печати и предназначенных для реконструкции костных дефектов. *Гены и клетки*. 2015; 10 (2): 39-45.
- Komlev V.S., Barinov S.M., Bozo I.I., Deev R.V., Eremin I.I., Sergeeva N.S. et al. Bioceramics composed of octacalcium phosphate demonstrate enhanced biological behavior. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2014; 6 (19): 16610-20.
- Каралкин П.А., Сергеева Н.С., Комлев В.С. и др. Биосовместимость и остеопластические свойства минерал-полимерных композиционных материалов на основе альгината натрия, желатина и фосфатов кальция, предназначенных для трехмерной печати костно-замещающих конструкций. *Гены и клетки*. 2016; 11 (3): 94-101.
- Inzana J.A., Trombetta R.P., Schwarz E.M. et al. 3D printed bioceramics for dual antibiotic delivery to treat implant-associated bone infection. *Eur. Cell. Mater.* 2015; 4 (30): 232-47.
- Bose S., Vahabzadeh S., Bandyopadhyay A. Bone Tissue Engineering Using 3D Printing. *Materials Today*. 2013; 16: 496-504. doi: 10.1016/j.mattod.2013.11.017.
- Kim H.W., Knowles J.C., Kim H.E. Porous scaffolds of gelatin-hydroxyapatite nanocomposites obtained by biomimetic approach: characterization and antibiotic drug release. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2005; 74 (2): 686-98. doi: 10.1002/jbmb.30236.
- Costa P.F. Bone Tissue Engineering Drug Delivery. *Curr. Mol. Bio Rep.* 2015; 1: 87-93. doi: 10.1007/s40610-015-0016-0.
- Melichercik P., Jahoda D., Nyc O. et al. Bone grafts as vancomycin carriers in local therapy of resistant infections. *Folia Microbiol. (Praha)*. 2012; 57(5): 459-62.
- Hernandez F.J., Hernandez L.I., Kavruk M. et al. NanoKeepers: stimuli responsive nanocapsules for programmed specific targeting and drug delivery. *Chem. Commun. (Camb)*. 2014; 50 (67): 9489-92. doi: 10.1039/c4cc04248d.
- Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. EUCAST Definitive document. *Clin. Microbiol. Infect.* 1998; 4: 291-96.
- Tack P., Victor J., Gemmel P., Annemans L. 3D-printing techniques in a medical setting: a systematic literature review. *Biomed. Eng. Online*. 2016; 15 (1): 115. doi: 10.1186/s12938-016-0236-4.
- Suzuki O., Imaizumi H., Kamakura S., Katagiri T. Bone regeneration by synthetic octacalcium phosphate and its role in biological mineralization. *Curr. Med. Chem.* 2008; 15 (3): 305-13.
- Polo-Corrales L., Latorre-Esteves M., Ramirez-Vick J.E. Scaffold design for bone regeneration. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014; 14 (1): 15-56.
- Tozzi G., De Mori A., Oliveira A., Roldo M. Composite Hydrogels for Bone Regeneration. *Materials*. 2016; 9 (4): 267-91. doi:10.3390/ma9040267.
- Inzana J.A., Olvera D., Fuller S.M. et al. 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials*. 2014; 35 (13): 4026-34. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.064.
- Inzana J.A., Schwarz E.M., Kates S.L., Awad H.A. Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis. *Biomaterials*. 2016; 81: 58-71. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.12.012.
- Reizner W., Hunter J.G., O'Malley N.T. et al. A systematic review of animal models for Staphylococcus aureus osteomyelitis. *Eur. Cell. Mater.* 2014; 27: 196-212.

REFERENCES

- Lew D.P., Waldvogel F.A. Osteomyelitis. *Lancet*. 2004; 364 (9431): 369-79. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16727-5.
- Jorge L.S., Chueire A.G., Rossit A.R. Osteomyelitis: a current challenge. *Braz. J. Infect. Dis.* 2010; 14 (3): 310-5.
- Treaba D., Assad L., Govil H. et al. Diagnostic role of fine-needle aspiration of bone lesions in patients with a previous history of malignancy. *Diagn. Cytopathol.* 2002; 26 (6): 380-3. doi: 10.1002/dc.10120.
- Seng P., Alliez A., Honnorat E. et al. Osteomyelitis of sternum and rib after breast prosthesis implantation. *IDCases*. 2014; 2 (1): 31-3. doi: 10.1016/j.idcr.2014.12.004.
- Olson M.E., Horswill A.R. Staphylococcus aureus osteomyelitis: bad to the bone. *Cell Host Microbe*. 2013; 13 (6): 629-31. doi: 10.1016/j.chom.2013.05.015.
- Trampuz A., Widmer A.F. Infections associated with orthopedic implants. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2006; 19 (4): 349-56. doi: 10.1097/01.qco.0000235161.85925.e8.
- Marculescu C.E., Berbari E.F., Cockerill F.R., Osmon D.R. Fungi, mycobacteria, zoonotic and other organisms in prosthetic joint infection. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2006; 451: 64-72. doi: 10.1097/01.blo.0000229337.21653.f2.
- Gogia J.S., Meehan J.P., Di Cesare P.E., Jamali A.A. Local antibiotic therapy in osteomyelitis. *Semin. Plast. Surg.* 2009; 23 (2): 100-7. doi: 10.1055/s-0029-1214162.



9. Pankratov A.S., Lekishvili M.V., Kopetskiy I.S. Bone plasty in dentistry and maxillofacial surgery. Osteoplastic materials. Moscow: BINOM; 2011 120-38 (in Russian).
10. Pertici G., Carinci F., Carusi G. et al. Composite polymer-coated mineral scaffolds for bone regeneration: from material characterization to human studies. J. Biol. Regul. Homeost. Agents. 2015; 29 (3 Suppl. 1): 136-48.
11. Sergeeva N.S., Komlev V.S., Sviridova I.K. et al. Some physicochemical and biological characteristics of 3D printed constructions based on sodium alginate and calcium phosphates for bone defects reconstruction. Genes & cells. 2015; 10 (2): 39-45 (in Russian).
12. Komlev V.S., Barinov S.M., Bozo I.I., Deev R.V., Eremin I.I., Sergeeva N.S. et al. Bioceramics composed of octacalcium phosphate demonstrate enhanced biological behavior. ACS Appl. Mater. Interfaces. 2014; 6 (19): 16610-20.
13. Karalkin P.A., Sergeeva N.S., Komlev V.S. et al. Biocompatibility and osteoplastic properties of mineral polymer composite materials based on sodium alginate, gelatin, and calcium phosphates intended for 3D-printing of the constructions for bone replacement. Genes & Cells. 2016; 11 (3): 94-101 (in Russian).
14. Inzana J.A., Trombetta R.P., Schwarz E.M. et al. 3D printed bioceramics for dual antibiotic delivery to treat implant-associated bone infection. Eur. Cell. Mater. 2015; 41(30): 232-47.
15. Bose S., Vahabzadeh S., Bandyopadhyay A. Bone Tissue Engineering Using 3D Printing. Materials Today. 2013; 16: 496-504. doi: 10.1016/j.mattod.2013.11.017.
16. Kim H.W., Knowles J.C., Kim H.E. Porous scaffolds of gelatin-hydroxyapatite nanocomposites obtained by biomimetic approach: characterization and antibiotic drug release. J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 2005; 74 (2): 686-98. doi: 10.1002/jbm.b.30236.
17. Costa P.F. Bone Tissue Engineering Drug Delivery. Curr. Mol. Bio Rep. 2015; 1: 87-93. doi: 10.1007/s40610-015-0016-0.
18. Melichercik P., Jahoda D., Nyc O. et al. Bone grafts as vancomycin carriers in local therapy of resistant infections. Folia Microbiol. (Praha). 2012; 57(5): 459-62.
19. Hernandez F.J., Hernandez L.I., Kavruk M. et al. NanoKeepers: stimuli responsive nanocapsules for programmed specific targeting and drug delivery. Chem. Commun. (Camb). 2014; 50 (67): 9489-92. doi: 10.1039/c4cc04248d.
20. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. EUCAST Definitive document. Clin. Microbiol. Infect. 1998; 4: 291-96.
21. Tack P., Victor J., Gemmel P., Annemans L. 3D-printing techniques in a medical setting: a systematic literature review. Biomed. Eng. Online. 2016; 15 (1): 115. doi: 10.1186/s12938-016-0236-4.
22. Suzuki O., Imaizumi H., Kamakura S., Katagiri T. Bone regeneration by synthetic octacalcium phosphate and its role in biological mineralization. Curr. Med. Chem. 2008; 15 (3): 305-13.
23. Polo-Corrales L., Latorre-Esteves M., Ramirez-Vick J.E. Scaffold design for bone regeneration. J. Nanosci. Nanotechnol. 2014; 14 (1): 15-56.
24. Tozzi G., De Mori A., Oliveira A., Roldo M. Composite Hydrogels for Bone Regeneration. Materials. 2016; 9 (4): 267-91. doi:10.3390/ma9040267.
25. Inzana J.A., Olvera D., Fuller S.M. et al. 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration. Biomaterials. 2014; 35 (13): 4026-34. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.064.
26. Inzana J.A., Schwarz E.M., Kates S.L., Awad H.A. Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis. Biomaterials. 2016; 81: 58-71. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.12.012.
27. Reizner W., Hunter J.G., O'Malley N.T. et al. A systematic review of animal models for Staphylococcus aureus osteomyelitis. Eur. Cell. Mater. 2014; 27: 196-212.

Сведения об авторах: Каралкин П.А. — канд. мед. наук, старший науч. сотр. отделения прогноза эффективности консервативного лечения МНИОИ им. П.А. Герцена; Сергеева Н.С. — доктор биол. наук, профессор РНИМУ им. Н.И. Пирогова, зав. отделением прогноза эффективности консервативного лечения МНИОИ им. П.А. Герцена; Комлев В.С. — доктор техн. наук, член-корр. РАН, зам. директора по науке ИМЕТ РАН; Свиридова И.К. — канд. биол. наук, ведущий науч. сотр. отделения прогноза эффективности консервативного лечения МНИОИ им. П.А. Герцена; Курсанова В.А., Ахмедова С.А. — кандидаты биол. наук, науч. сотр. отделения прогноза эффективности консервативного лечения МНИОИ им. П.А. Герцена; Шанский Я.Д., Кувшинова Е.А. — младшие науч. сотр. отделения прогноза эффективности консервативного лечения МНИОИ им. П.А. Герцена; Федотов А.Ю. — канд. техн. наук, старший науч. сотр. лаборатории керамических композиционных материалов ИМЕТ РАН; Тетерина А.Ю. — младший науч. сотр. лаборатории керамических композиционных материалов ИМЕТ РАН; Баринов С.М. — доктор техн. наук, член-корр. РАН, зав. лаборатории керамических композиционных материалов ИМЕТ РАН; Каприн А.Д. — доктор мед. наук, профессор, акад. РАН, генеральный директор НМИРЦ.

Для контактов: Каралкин Павел Анатольевич. E-mail: prognos.06@mail.ru.

Contact: Karalkin P.A. – cand. med. sci., senior research worker, department of conservative treatment efficacy prognosis, MNIOT named after P.A. Gertsen – branch of NMIRTs. E-mail: prognos.06@mail.ru.

ВНИМАНИЕ !

Подписаться на «Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова» можно в любом почтовом отделении

Наши индексы в Каталоге «ГАЗЕТЫ И ЖУРНАЛЫ» АО «Роспечать»:

для индивидуальных подписчиков **73064**

для предприятий и организаций **72153**

В розничную продажу «Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова» не поступает

