

DOI: 10.15690/vramn905

А.Г. Самохин¹, Ю.Н. Козлова², Д.В. Корнеев³, О.С. Таранов³, Е.А. Фёдоров¹,
В.В. Павлов¹, В.В. Морозова², Н.В. Тикунова²¹ Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна,
Новосибирск, Российская Федерация² Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Российская Федерация³ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Кольцово, Российская Федерация

Экспериментальное исследование антибактериальной активности литического стафилококкового бактериофага *ph20* и литического бактериофага синегнойной палочки *ph57* при моделировании их импрегнации в ортопедические полимерные конструкции из полиметилметакрилата (костного цемента)

59

Обоснование. Проблема бактериальной колонизации используемых в медицинской практике имплантатов из различных материалов продолжает оставаться актуальной, независимо от использованного для их изготовления материала. Отдельного внимания заслуживают имплантируемые в организм человека полимерные имплантаты, которые изготавливают *ex tempore* (по мере необходимости) из полиметилметакрилата, например при ортопедических хирургических вмешательствах (так называемый костный цемент). Защита таких имплантатов путем импрегнации в них антибиотиков подвергается множественной критике, поэтому в качестве альтернативы антибиотикам могут быть использованы литические бактериофаги, обладающие рядом уникальных преимуществ, однако экспериментальных работ по изучению возможности импрегнации бактериофагов в полиметилметакрилат и антибактериальной активности в таких условиях в литературе не опубликовано. **Цель исследования** — изучить возможность физического размещения бактериофагов в полиметилметакрилате и в модели *in vitro* охарактеризовать литический антибактериальный эффект двух различных штаммов бактериофагов при их импрегнации в изготавливаемый *ex tempore* полимерный носитель на этапе полимеризации. **Методы.** Первым этапом была проведена атомно-силовая микроскопия (АСМ) образцов полиметилметакрилата медицинского назначения для выяснения наличия и размеров каверн, образовавшихся после завершения полимеризации при различном диапазоне температур реакционной смеси (+6...+25 °C и +18...+50 °C). Вторым этапом *in vitro* было проведено импрегнация двух различных штаммов бактериофагов (*ph20*, активного в отношении *Staphylococcus aureus*, и *ph57*, активного в отношении *Pseudomonas aeruginosa*) в полиметилметакрилат на этапе полимеризации с последующим определением их антибактериальной активности. **Результаты.** В ходе выполнения АСМ установлена возможность размещения бактериофагов в кавернах полиметилметакрилата: медиана сечения и глубины каверн на внешней поверхности образца, полимеризованного при температуре +18...+50 °C, составила 100,0 и 40,0 нм соответственно, а на поверхности поперечного скола образца — 120,0 и 100,0 нм соответственно, что статистически не отличалось от геометрических размеров каверн образца, полимеризованного при температуре +6...+25 °C. Изучение антибактериальной активности показало, что импрегнированный при +6...+25 °C в полиметилметакрилат стафилококковый бактериофаг *ph20* утратил эффективный титр уже в течение первых шести суток с момента начала эксперимента, тогда как синегнойный бактериофаг *ph57* сохранял эффективный титр как минимум в течение 13 сут. **Заключение.** В исследовании была подтверждена возможность импрегнации бактериофагов в полиметилметакрилат медицинского назначения с поддержанием эффективного титра бактериофага при его эмиссии во внешнюю среду, что открывает пути возможного применения такого способа доставки бактериофагов в клинической практике. Также сделаны предположения о вероятной подверженности некоторых бактериофагов агрессивным воздействиям со стороны химических компонентов «костного цемента» и/или продуктов реакции полимеризации, что требует строгого отбора пригодных для подобного способа доставки штаммов бактериофагов.

Ключевые слова: бактериофаг, инфекция, костный цемент, полиметилметакрилат, *ex tempore*.

(Для цитирования: Самохин А.Г., Козлова Ю.Н., Корнеев Д.В., Таранов О.С., Фёдоров Е.А., Павлов В.В., Тикунова Н.В. Экспериментальное исследование антибактериальной активности литического стафилококкового бактериофага *ph20* и литического бактериофага синегнойной палочки *ph57* при моделировании их импрегнации в ортопедические полимерные конструкции из полиметилметакрилата (костного цемента). *Вестник РАМН*. 2018;73(1):59–68. doi: 10.15690/vramn905)

Обоснование

Проблема полирезистентных штаммов патогенных микроорганизмов в клинической практике с каждым годом приобретает все большие масштабы, в связи с чем клиницистам по всему миру все чаще приходится сталкиваться со штаммами бактерий, против которых или нет эффективного антибиотика, или же для лечения возможен лишь один класс антибиотиков [1]. Одной из причин такого распространения бактериальной резистентности является наличие бактериальных биопленок, существенно осложняющих проникновение многих антибиотиков к мишеням. Надо отметить, что бактериальной колонизации могут быть подвержены любые виды хирургических имплантатов независимо от материала — будь то металлические либо полимерные, с последующим быстрым образованием биопленок на поверхности изделия (рис. 1) [2].

Широкое внедрение в медицинскую практику имплантируемых полимерных изделий привело к необходимости поиска способов их антибактериальной защиты. Особого внимания заслуживают имплантируемые в организм человека ортопедические полимерные конструк-

ции, которые изготавливают *ex tempore* (по мере надобности) в условиях операционной: речь идет о полиметилметакрилатных имплантатах различной конфигурации, применяемых при ортопедических хирургических вмешательствах на крупных суставах конечностей, при реконструктивных вмешательствах на позвоночнике и т.д. (так называемый костный цемент). Их использование подчас сопряжено с потенциально возможной бактериальной колонизацией такого полимерного имплантата, поэтому некоторые врачи-ортопеды, а также ряд производителей полимеров медицинского назначения нередко добавляют в состав такого полимера антибиотика как некое универсальное решение для обеспечения возможности санации имплантационного ложа после установки имплантата за счет диффузии антибиотика в окружающие ткани, поскольку в противном случае лечение присоединившихся инфекций области хирургического вмешательства становится чрезмерно затратным с экономической и сложным с клинической точки зрения.

Однако такой способ защиты имплантата из полиметилметакрилата также не является совершенным, поскольку диффузия антибиотика в окружающие ткани при хорошо гомогенизированном полиметилметакри-

A.G. Samokhin¹, Y.N. Kozlova², D.V. Korneev³, O.S. Taranov³, E.A. Fedorov¹, V.V. Pavlov¹, N.V. Tikunova²

¹ Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsivyan, Novosibirsk, Russian Federation

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

³ Federal Scientific Centre of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Russian Federation

Experimental Study of the Antibacterial Activity of the Lytic *Staphylococcus Aureus* Bacteriophage *Ph20* and Lytic *Pseudomonas Aeruginosa* Bacteriophage *Ph57* when Modelling Impregnation into Poly (Methylmetacrylate) Orthopedic Implants (Bone Cement)

Background: The problem of bacterial colonization of implants used in medical practice continues to be relevant regardless of the material of the implant. Particular attention should be given to polymeric implants which are produced “*ex tempore*” from polymethyl methacrylate, for example, during orthopedic surgical interventions (so-called «bone cement»). The protection of such implants by antibiotic impregnation is subjected to multiple criticisms; therefore, as an alternative to antibiotics, lytic bacteriophages with a number of unique advantages can be used — however, no experimental studies have been published on the possibility of impregnating bacteriophages into polymethyl methacrylate and their antibacterial activity assessment under such conditions. **Aims:** To evaluate the possibility of physical placement of bacteriophages in polymethylmethacrylate and to characterize the lytic antibacterial effect of two different strains of bacteriophages when impregnated into polymer carrier *ex tempore* during the polymerization process in *in vitro* model. **Materials and methods:** First stage — Atomic force microscopy (AFM) of polymethyl methacrylate samples for medical purposes was used to determine the presence and size of caverns in polymethyl methacrylate after completion of its polymerization at various reaction temperatures (+6...+25°C and +18...+50°C). The second stage was performed *in vitro* and included an impregnation of two different bacteriophage strains (phage *ph20* active against *S. aureus* and *ph57* active against *P. aeruginosa*) into polymethyl methacrylate during the polymerization process, followed by determination of their antibacterial activity. **Results:** ACM showed the possibility of bacteriophages placement in the cavities of polymethyl methacrylate — the median of the section and the depth of cavities on the outer surface of the polymer sample polymerized at +18...+50°C were 100.0 and 40.0 nm, respectively, and on the surface of the transverse cleavage of the sample — 120.0 and 100.0 nm, respectively, which statistically did not differ from the geometric dimensions of the caverns of the sample polymerized at a temperature of +6...+25°C. The study of antibacterial activity showed that the *ph20* bacteriophage impregnated in polymethyl methacrylate at +6...+25°C lost its effective titer within the first six days after the start of the experiment, while the phage *ph57* retained an effective titer for at least 13 days. **Conclusion:** the study confirmed the possibility of bacteriophages impregnation into medical grade polymethyl methacrylate, maintaining the effective titer of the bacteriophage during phage emission into the external environment, which opens the way for the possible application of this method of bacteriophage delivery in clinical practice. It is also assumed that certain bacteriophages are susceptible to aggressive influences from the chemical components of «bone cement» and/or polymerization reaction products which requires strict selection of bacteriophage strains that could be suitable for this method of delivery.

Key words: bacteriophages, infection, bone cements, polymethyl methacrylate.

(**For citation:** Samokhin AG, Kozlova YN, Korneev DV, Taranov OS, Fedorov EA, Pavlov VV, Tikunova NV. Experimental Study of the Antibacterial Activity of the Lytic *Staphylococcus Aureus* Bacteriophage *Ph20* and Lytic *Pseudomonas Aeruginosa* Bacteriophage *Ph57* when Modelling Impregnation into Poly (Methylmetacrylate) Orthopedic Implants (Bone Cement). *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2018;73(1):59–68. doi: 10.15690/vramn905)

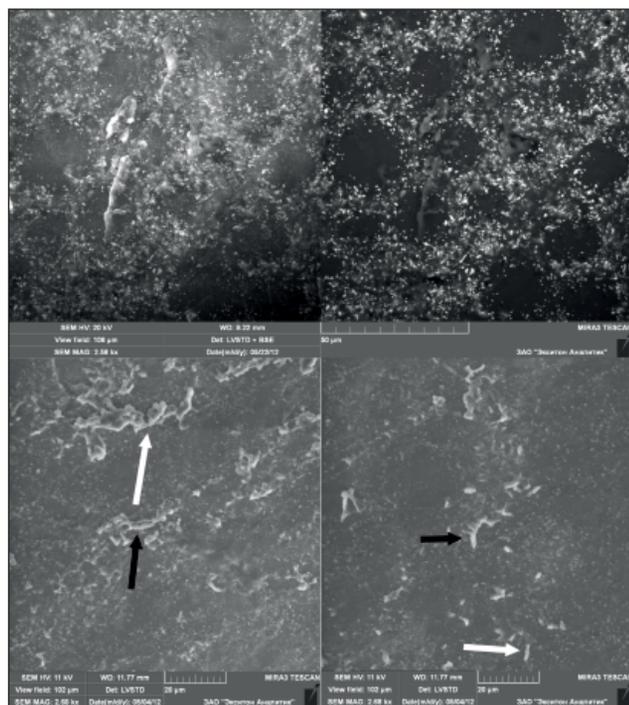


Рис. 1. Сформированная био пленка на поверхности полимерного имплантата из полиметилметакрилата, эксплантированного в ходе хирургического вмешательства

Примечание. Для био пленки на полимерных материалах характерно морфологическое разнообразие. На одном образце могут обнаруживаться как кокковые (белая стрелка), так и удлиненные (черная стрелка) формы бактерий, располагающиеся на поверхности в виде отдельных колоний. Сканирующая электронная микроскопия (фото сделано авторами).

лате может не происходить вовсе из-за возможного отсутствия проницаемости полиметилметакрилата для антибиотика [3] и чрезмерно высокой скорости эмиссии антибиотика из такого носителя, что радикально уменьшает сроки его терапевтической эффективности [4]. Помимо этого, в опубликованных в мировой литературе метааналитических и литературных обзорах последних лет показано, что импрегнация антибиотика в полиметилметакрилат демонстрирует эффективность не для всех видов классифицируемых в ортопедии локализаций и типов течения инфекционного процесса, показана вероятность развития интоксикации и гиперчувствительности к антибиотику наряду с нежелательной селекцией антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов [5, 6].

В качестве потенциальных кандидатов на роль терапевтического агента для защиты полимерных и металлоимплантатов, помимо антибиотиков, могут быть использованы также литические бактериофаги, которые в силу особенностей своей морфологии и активности обладают рядом уникальных преимуществ по сравнению с антибиотиками, в том числе способностью вырабатывать эндолизины, приводящие к лизису бактерий, а также преодолевать экзополимерный субстрат бактериальных био пленок, вызывая в них значительные изменения [7–9]. Поэтому применение литических бактериофагов для лизиса бактерий в био пленках или же разрушение самой структуры экзополисахарида под воздействием ферментных структур, кодируемых бактериофагами, представляются наиболее перспективными методами предотвращения колонизации имплантатов медицинского назначения.

Вместе с тем, поскольку экспериментальные исследования, посвященные фармакокинетике высвобождения терапевтических агентов из полиметилметакрилата в мировой литературе сравнительно редки, особенно по современному компонентному составу полимеров на его основе, то исследовательские работы в данной области всегда представляют живой интерес для практических врачей тех специальностей, что используют в своей повседневной деятельности подобные, формируемые *ex tempore* имплантаты из полиметилметакрилата. Отдельный интерес при этом представляет установление возможности использования бактериофагов в качестве альтернативного антибиотикам терапевтического агента для защиты полимерного носителя из полиметилметакрилата в условиях эксперимента *in vitro* для дальнейшей возможной экстраполяции его результатов на инфекционный процесс в окружающих имплантат тканях уже в условиях *in vivo*, поскольку на настоящий момент подобных сведений в мировой литературе не представлено. Дополнительный интерес представляет также и проблема защиты бактериофагов при такого рода импрегнации против термического разрушения бактериофагов в ходе реакции полимеризации под воздействием высоких температур.

В этой связи была сформулирована **цель исследования:** изучить возможность размещения бактериофагов в образцах полимеризованного полиметилметакрилата с точки зрения соответствия бактериофагов геометрическим характеристикам поверхности образцов и в модели *in vitro* охарактеризовать литический антибактериальный эффект двух различных штаммов бактериофагов при их импрегнации в изготавливаемый *ex tempore* полимерный носитель (полиметилметакрилат) на этапе полимеризации.

Методы

Условия эксперимента

Исследование было проведено двухэтапно: первым этапом была проведена атомно-силовая микроскопия (АСМ) образцов полиметилметакрилата, используемого при выполнении ортопедических хирургических вмешательств, которое требовалось для выяснения возможного наличия и размеров образовавшихся каверн после завершения его полимеризации при различной температуре окружающей среды.

Вторым этапом в лабораторных условиях было проведено моделирование для определения возможности добавления двух различных штаммов бактериофагов в полиметилметакрилат на этапе полимеризации с последующим определением их антибактериальной активности *in vitro*:

- 1) бактериофага *ph20* (штамм депонирован в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора под номером *Ph-1312*), активного в отношении *Staphylococcus aureus*. В качестве бактериального тест-штамма был использован метициллинрезистентный *S. aureus* ATCC 43300 (США);
- 2) бактериофага *ph57* (штамм депонирован в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора под номером *Ph-357*), активного в отношении *Pseudomonas aeruginosa*. В качестве бактериального тест-штамма был использован тест-штамм *P. aeruginosa* ATCC 9027 (США).

На обоих этапах приготовление образцов полиметилметакрилата осуществляли с использованием коммер-

чески доступного полиметилметакрилата медицинского назначения DePuy SmartSet HV (DePuy International Ltd, Великобритания), состоящего из стерильного сухого вещества сополимера метилметакрилат/метакрилат с индуктором полимеризации (перекись бензоила) и стерильной жидкой фракции мономера (метилметакрилат) с кофактором полимеризации (N,N-диметил-р-толуидин).

Непосредственно полимеризацию производили на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН следующим способом: получаемую в стерильных чашках Петри в ходе перемешивания порошкообразного полимера и жидкого мономера стерильную реакционную смесь охлаждали до температуры +6...+25 °С на заранее приготовленном и охлажденном до -80 °С транспортном пластиковом контейнере, содержащем охлаждающий агент, разместив на нем чашки Петри, для снижения теплового выхода экзотермической реакции полимеризации, что позволяет существенно понизить пиковую температуру экзотермической реакции полимеризации со штатных 50–70 °С до 25 °С и тем самым снизить вероятность термического разрушения бактериофагов. Смешивание полимера и мономера производили в соотношении 1:2, т.е. к 1,0 г сухого вещества полимера добавляли 0,5 мл жидкого мономера. Указанную процедуру проводили с трехкратным контролем температуры при помощи инфракрасного дистанционного пирометра, что обеспечивало бесконтактное измерение температурных показаний в стерильной реакционной смеси при смешивании полимера и мономера с индуктором полимеризации.

Первый этап. Атомно-силовую микроскопию полимеризованных образцов полиметилметакрилата выполняли на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Для этого был использован коммерчески доступный полиметилметакрилат медицинского назначения без добавления модифицирующих агентов (таких как антибиотики и т.п.), полимеризация которого была произведена двумя разными способами.

Первый — вышеописанный способ полимеризации реакционной смеси в диапазоне температур +6...+25 °С при температуре окружающей среды +24 °С с использованием принудительного охлаждения реакционной смеси. Максимальная достигнутая кратковременная пиковая температура реакционной смеси составила при этом +24,7 °С, средняя температура — +12,0 °С.

Второй — вышеописанный способ полимеризации реакционной смеси в диапазоне температур +18...+50 °С при температуре окружающей среды +24 °С без дополнительного охлаждения реакционной смеси (для моделирования температурных условий полимеризации в типичных вариантах применения *ex tempore* полиметилметакрилата медицинского назначения в медучреждениях). Максимальная достигнутая кратковременная пиковая температура реакционной смеси составила при этом +49,2 °С, средняя температура — +31,3 °С.

После этого полученные полимерные образцы по достижении затвердевания были подвергнуты АСМ, выполненной на АСМ-микроскопе SolverBio 47 с зондами HA_HR серии ETALON (НТ-МДТ, Россия). Атомно-силовую микроскопию осуществляли по внешней поверхности образцов и по поверхности их поперечных сколов с целью визуализации профиля внешней поверхности и поверхности по линии поперечных сколов образцов, подсчета геометрических размеров каверн и их количества на единицу площади поверхности.

Для изучения рельефа внешней поверхности образцы закрепляли на предметном стекле при помощи цианоакрилатного клея. Для изучения поверхности поперечных сколов образцы разбивали ударом молотка через бумажные прокладки, осколки фиксировали на предметном стекле цианоакрилатным клеем.

Все снимки АСМ представлены в формате топографической карты поверхности. Измерение латеральных размеров каверн в образцах выполняли по топографическим снимкам, используя встроенное программное обеспечение микроскопа. Глубину каверн оценивали по топографическим профилям (сечениям) поверхности образцов.

Второй этап — моделирование для определения возможности добавления литического стафилококкового бактериофага *ph20*, активного в отношении метициллинрезистентного тест-штамма *S. aureus* ATCC 43300 (США), в полиметилметакрилат на этапе полимеризации и определение его антибактериальной активности *in vitro* к указанному тестовому штамму. Параллельно аналогичное моделирование было проведено со штаммом бактериофага *ph57*, активным в отношении *P. aeruginosa*, с определением его антибактериальной активности *in vitro* в отношении тест-штамма *P. aeruginosa* ATCC 9027 (США).

Модельный эксперимент проводили в условиях полимеризации в интервале температур реакционной смеси +6...+25 °С. По достижении стабилизации температуры в указанном интервале в реакционную смесь добавляли 100 мкл раствора, содержащего бактериофаг *ph20* в усредненном титре $1,1 \times 10^9$ БОЕ/мл (бляшкообразующие единицы на миллилитр) либо бактериофаг *ph57* в усредненном титре $2,4 \times 10^7$ БОЕ. После этого полимер повторно перемешивали до достижения гомогенного состояния получившейся полимерной композиции и придавали нужную (сферическую) конфигурацию конечному полимерному образцу для обеспечения возможности его размещения в стерильную пробирку, в которую после этого добавляли 1 мл физиологического раствора и помещали в термостат при +37 °С.

Для каждого использованного в эксперименте штамма бактериофага были изготовлены по 21 полимерному образцу, содержащему бактериофаг в составе полимерной композиции: серии по три идентичных образца на каждую из семи запланированных временных точек оценки литического действия бактериофага (результат оценивали спустя 1, 6, 9, 13, 16, 19 и 22 сут с момента приготовления образцов).

Результат литического действия бактериофага определяли путем анализа активности фаговых частиц методом двухслойного агара, в ходе которого подсчитывали количество негативных колоний (прозрачные пятна на матовом фоне глубинного роста бактерий) на каждой чашке Петри. Количество фаговых частиц рассчитывали по формуле:

$$K = A \times 1000 \times 10^n / V,$$

где K — количество фаговых частиц в 1 мл препарата, A — количество негативных колоний в чашке Петри, V — объем высеваемой пробы (в мл), 10^n — порядковый номер разведения препарата, по которому производится расчет фаговых частиц.

Полученный в ходе вычислений результат интерпретировали следующим образом: достижение бактериофагом концентрации (титра) не менее 10^6 БОЕ/мл свидетельствует об эффективном литическом (антибакте-

риальном) воздействию бактериофага на целевой штамм микроорганизма(ов).

Этическая экспертиза

Проведенное исследование не нуждается в этической экспертизе (выписка из протокола Комитета по биоэтической этике ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России № 080/17 от 10.10.2017).

Статистический анализ

Принципы расчета размера выборки

Предварительный расчет выборки в настоящем экспериментальном исследовании не производили.

Методы статистического анализа данных

Статистическую обработку полученных результатов исследования проводили при помощи программного обеспечения IBM SPSS v19.0 (США) путем вычисления описательных статистик и сравнения значений переменных, относящихся к дискретной шкале. Все описательные статистики представлены в виде непараметрических статистик — медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей [Q1; Q3].

В ходе первого этапа исследования при выполнении АСМ-исследования поверхностей полимерных образцов с учетом малых размеров выборок наблюдений при выполнении измерений в различных точках ($n=15$) поверхности образцов сравнения между полимеризованными при различных условиях образцами проводили непараметрическим ранговым методом Вилкоксона. Различия сравниваемых величин при межгрупповом сравнении считали значимыми при значениях, не превышающих порогового уровня (α) отклонения нулевой гипотезы при двусторонней статистической значимости, принятого как $\alpha=0,01$.

Результаты

Для уточнения возможности использования полиметилметакрилата в качестве потенциального носителя для бактериофагов была проведена АСМ отвержденных образцов полиметилметакрилата, полимеризованных при описанных в разделе «Методы» условиях, в ходе которой было показано, что структура отвержденного полимера представляет собой кавернистую матрицу (рис. 2–9). Зарегистрированные медианы сечения и глубины каверн по внешней поверхности образцов и по их поперечным сколам представлены в табл. 1.

Атомно-силовая микроскопия образцов показала что, во-первых, геометрические размеры каверн в образцах не имеют статистически значимых различий при использованных температурных режимах полимеризации (во всех случаях сравнений образцов пороговый уровень отклонения нулевой гипотезы $\alpha=0,01$ не был достигнут), а во-вторых, геометрия каверн и их количество на 1 мм² площади поверхности позволяет говорить о возможности размещения в них наноразмерных частиц, к которым относятся бактериофаги.

После того как была установлена возможность размещения бактериофагов в кавернах полиметилметакрилата, был проведен второй этап эксперимента в условиях *in vitro*, направленный на определение практической возможности депонирования бактериофагов *ph20* и *ph57* в кавернах полиметилметакрилата, формируемых в ходе полимеризации последнего, и оценке их возможного литического антибактериального эффекта при эмиссии из полимера.

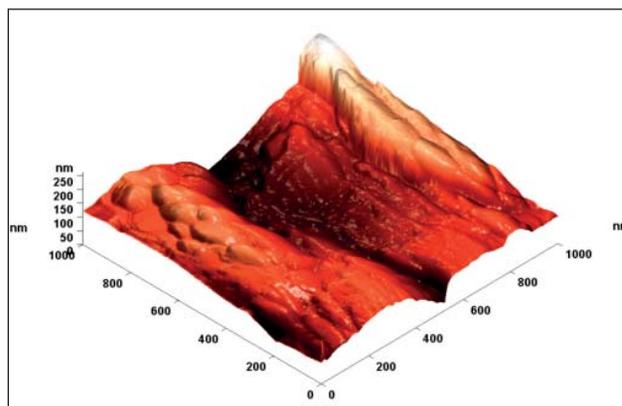


Рис. 2. Атомно-силовая микроскопия внешней поверхности образца, полимеризованного при температуре +6...+25 °С

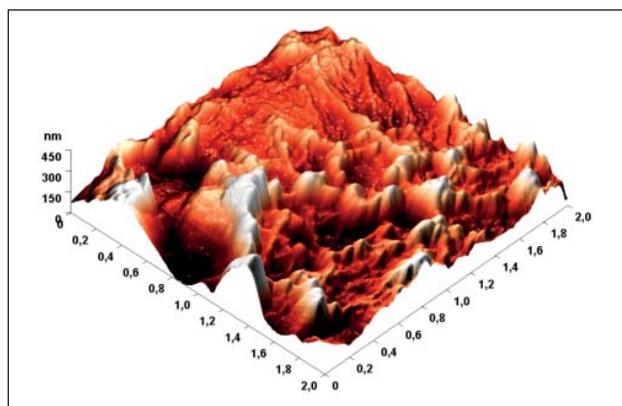


Рис. 3. Атомно-силовая микроскопия поверхности поперечного скола образца, полимеризованного при температуре +6...+25 °С

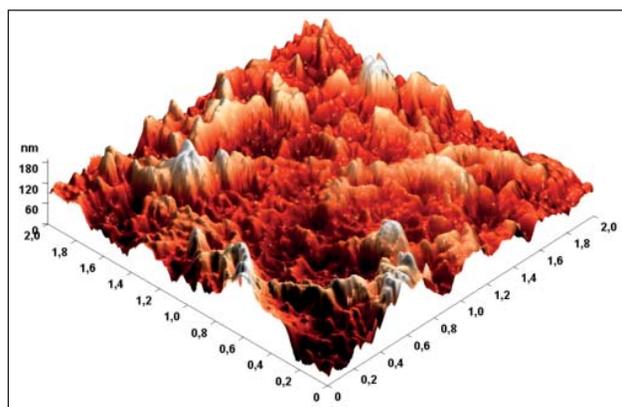


Рис. 4. Атомно-силовая микроскопия поверхности поперечного скола образца, полимеризованного при температуре +18...+50 °С

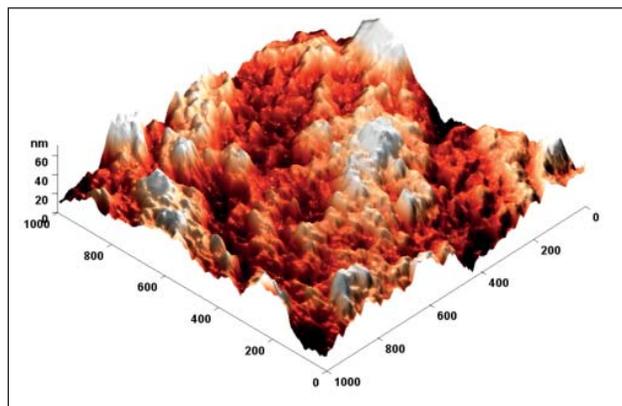


Рис. 5. Атомно-силовая микроскопия внешней поверхности образца, полимеризованного при температуре +18...+50 °С

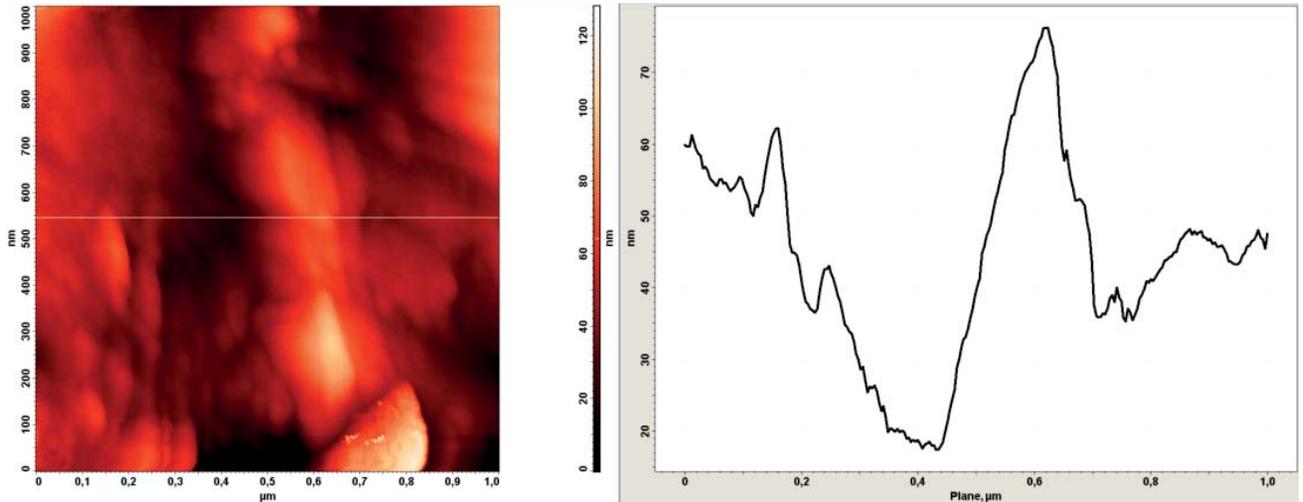


Рис. 6. Атомно-силовая микроскопия поверхности и профиля внешней поверхности образца, полимеризованного при температуре +6...+25 °С

64

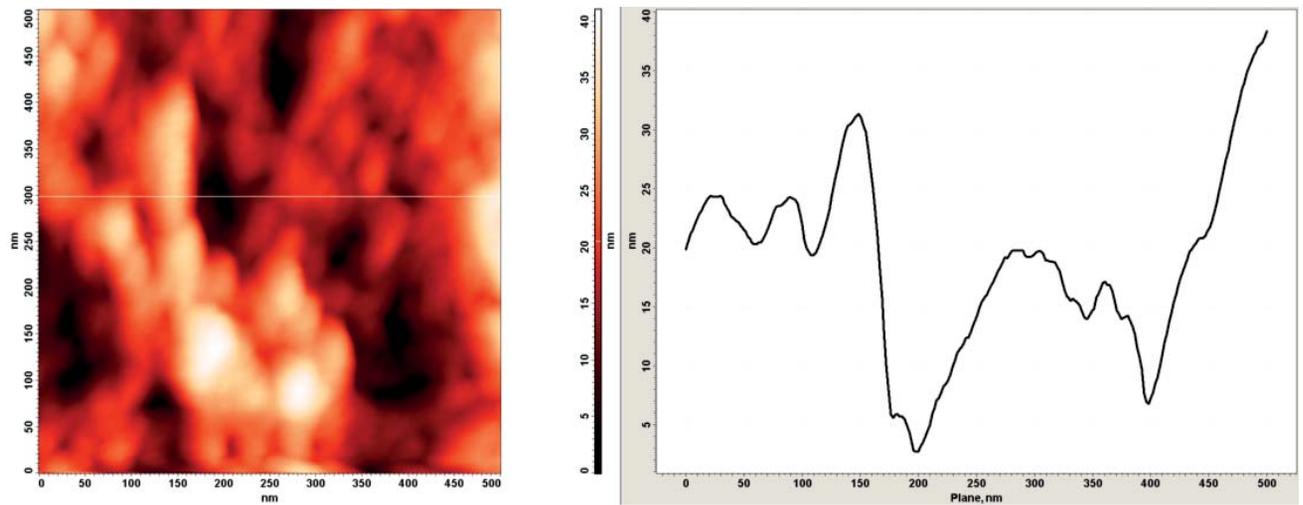


Рис. 7. Атомно-силовая микроскопия поверхности и профиля поверхности поперечного скола образца, полимеризованного при температуре +6...+25 °С

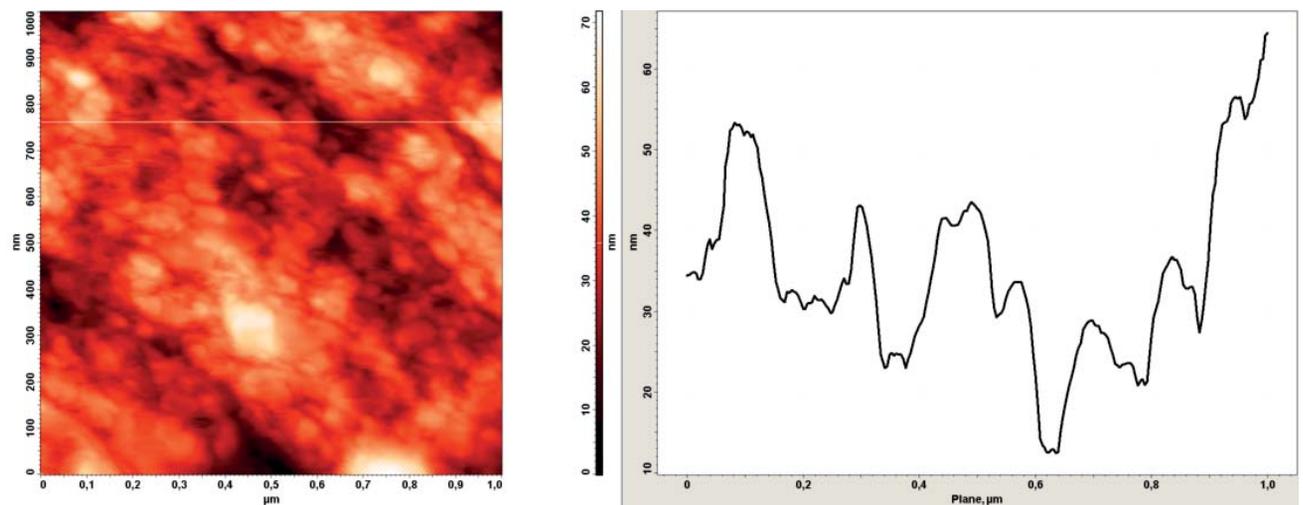


Рис. 8. Атомно-силовая микроскопия поверхности и профиля внешней поверхности образца, полимеризованного при температуре +18...+50 °С

Для этого был проведен модельный эксперимент, условия которого предусматривали импрегнацию бактериофага в полимер (полиметилметакрилат) с последующей гомогенизацией получившейся реакционной смеси (фаго-

полимерной композиции) и приданием сферической конфигурации образцу с преимущественным распределением бактериофага в поверхностных слоях образца. Результаты эксперимента для различных использованных штаммов

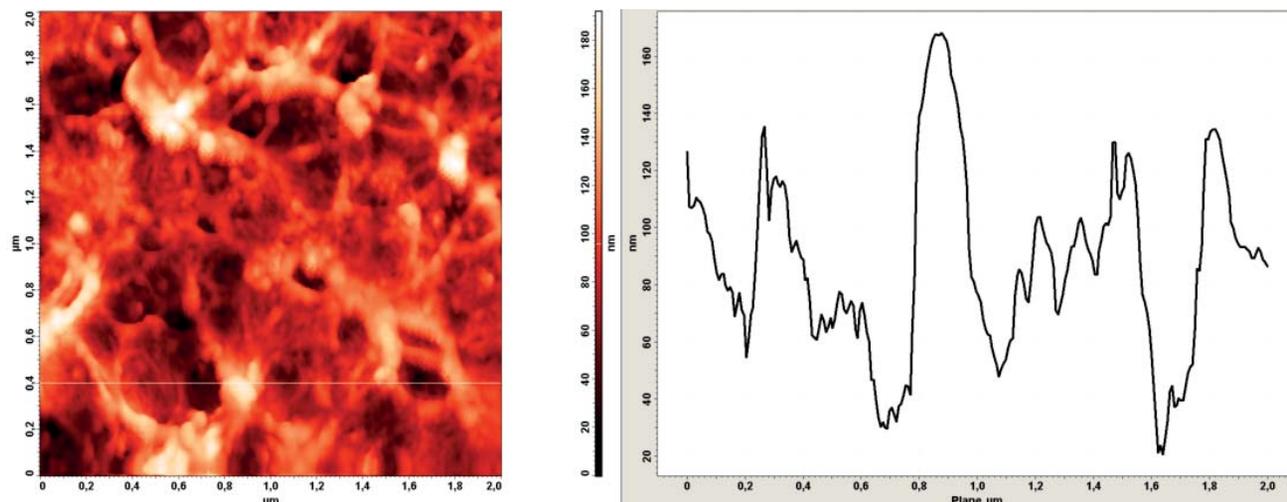


Рис. 9. Атомно-силовая микроскопия поверхности и профиля поверхности поперечного скола образца, полимеризованного при температуре +18...+50 °С

Таблица 1. Зарегистрированные размеры сечения и глубины каверн по внешней поверхности образцов и по их поперечным сколам (Ме [Q1; Q3])

Параметр	Сечение каверн, нм	Глубина каверн, нм	Кол-во каверн на 1 мм ²
На внешней поверхности образца, полимеризованного при +18...+50 °С	100,0 [70,00; 140,00]	40,0 [30,00; 53,00]	От 4 до 12
На внешней поверхности образца, полимеризованного при +6...+25 °С	110,0 [25,00; 230,00] <i>p</i> =0,705*	47,0 [30,75; 117,50] <i>p</i> =0,817*	От 1 до 5
На поверхности поперечного скола образца, полимеризованного при +18...+50 °С	120,0 [90,00; 160,00]	100,0 [60,00; 130,00]	От 4 до 12
На поверхности поперечного скола образца, полимеризованного при +6...+25 °С	190,0 [60,00; 310,00] <i>p</i> =0,262**	32,0 [18,00; 121,50] <i>p</i> =0,027**	От 1 до 11

Примечание. * — при сравнении с образцом, внешняя поверхность которого была полимеризована при +24 °С; ** — при сравнении с образцом, поверхность поперечного скола которого была полимеризована при +24 °С.

бактериофагов представлены в табл. 2 и 3, из которых следует, что бактериофаг *ph20* после его импрегнации в полиметилметакрилат фактически утратил эффективный

титр уже в течение первых шести суток с момента начала эксперимента, тогда как бактериофаг *ph57* сохранял эффективный титр как минимум в течение 13 суток.

Таблица 2. Величины титра бактериофага *ph20* в исследуемых образцах (*n*=7)

№ образца	Средняя достигнутая температура реакционной смеси в ходе реакции полимеризации каждого образца, °С	Титр бактериофага <i>ph20</i> в физиологическом растворе после 12 ч инкубации образцов с импрегнированным в них бактериофагом при температуре +37 °С, БОЕ/мл	Титр бактериофага после культивирования образцов с импрегнированным в них бактериофагом с культурой тест-штамма <i>S. aureus</i> ATCC 43300, БОЕ/мл
1	15,76	1×10 ⁴	1,5×10 ⁶ (через 1 суток от начала эксперимента)
2	13,56	4×10 ²	0 (ноль) (через 6 суток)
3	16,10	6×10 ²	0 (ноль) (через 9 суток)
4	5,61	1×10 ²	0 (ноль) (через 13 суток)
5	14,36	1×10 ²	0 (ноль) (через 16 суток)
6	19,42	0 (ноль)	0 (ноль) (через 19 суток)
7	8,13	4×10 ⁵	0 (ноль) (на 22-е сутки)

Таблица 3. Величины титра бактериофага *ph57* в исследуемых образцах ($n=7$)

№ образца	Средняя достигнутая температура реакционной смеси в ходе реакции полимеризации каждого образца, °С	Титр бактериофага в физиологическом растворе после 12 ч инкубации образцов с импрегнированным бактериофагом при температуре +37 °С, БОЕ/мл	Титр бактериофага после культивирования образцов с импрегнированным в них бактериофагом с культурой тест-штамма <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027, БОЕ/мл
1	13,81	2×10^6	1×10^9 (через 1 сутки от начала эксперимента)
2	10,95	$9,6 \times 10^5$	$6,7 \times 10^8$ (через 6 суток)
3	5,34	$3,4 \times 10^6$	$8,5 \times 10^8$ (через 9 суток)
4	7,63	3×10^6	5×10^8 (через 13 суток)
5	15,89	$2,7 \times 10^6$	5×10^6 (через 16 суток)
6	18,42	8×10^5	0 (ноль) (через 19 суток)
7	14,16	$4,5 \times 10^6$	0 (ноль) (на 22-е сутки)

Обсуждение

Полученный результат свидетельствует о том, что при осуществлении в ходе полимеризации образцов перемешивания полимера до достижения гомогенного состояния получившейся полимерной композиции (что соответствует таковому при приготовлении аналогичных композиций в клинической практике) размещение в составе такой композиции бактериофага позволяет ожидать эмиссии бактериофага из каверн полимерного образца во внешнюю среду, поскольку зарегистрированные в ходе выполнения АСМ геометрические размеры каверн и их количество на 1 мм^2 площади поверхности позволяют говорить о возможности размещения в них наноразмерных частиц, к которым относятся бактериофаги, что в конечном итоге предопределяет возможность импрегнации бактериофагов в полиметилметакрилат, например на этапе полимеризации последнего, и тем самым открывает возможность использовать полимерные имплантаты из полиметилметакрилата в качестве носителя для бактериофагов, что несет практическое значение для хирургических направлений в медицине.

При этом авторы не ставят под сомнение тот факт, что в ходе гомогенизации реакционной смеси полиметилметакрилата и бактериофага последние попадают как внутрь полимерной композиции, так и в ее поверхностный слой, контактирующий непосредственно с внешней средой, однако определить точное количество и соотношение сорбции бактериофагов внутри и снаружи полимерной композиции практически невозможно.

Результаты эксперимента также показывают, что с учетом характера использованного полимерного носителя (не обладает возможностью биоразложения, отверждение в ходе полимеризации является необратимым процессом) в случае полного погружения бактериофага в полимер либо в случае плохой гомогенизации возможность диффузии бактериофага сквозь каверны в структуре полимера будет отсутствовать, что будет выражаться в минимальных и клинически незначимых титрах бактериофага, не достигающих терапевтических величин, вследствие чего не будет происходить подавления роста колоний микроорганизма в ходе дальнейшей проверки литической активности бактериофага с тестовым штаммом микроорганизма.

С учетом вышесказанного можно говорить о том, что непосредственно антибактериальную эффективность терапевтического агента, помещенного в полиметилмета-

крилат, будет обеспечивать лишь та его часть, что в ходе гомогенизации попала в поверхностный слой полимера, откуда возможна диффузия во внешнюю среду из каверн, расположенных на поверхности полимерной композиции, отвержденной после полимеризации.

Несмотря на отсутствие в доступной мировой литературе публикаций, посвященных анализу литической активности в ходе эмиссии во внешнюю среду бактериофагов, помещенных в полиметилметакрилат, в пользу сделанных выше предположений говорят результаты многочисленных опубликованных работ, посвященных изучению фармакокинетики эмиссии во внешнюю среду антибиотиков, помещенных в полиметилметакрилат медицинского назначения: принципиальная суть таких исследований может быть экстраполирована и на полимерные композиции на основе полиметилметакрилата с импрегнированным бактериофагом. Так, в работе A. Baker и L. Greenham [3] было показано, что диффузия антибиотика в окружающие ткани при хорошо гомогенизированном полимере, например при использовании полиметилметакрилата, может не происходить вовсе из-за возможного отсутствия проницаемости полимерного цемента для антибиотика, поскольку данный материал не является биоразлагаемым. В работах других авторов, также работавших с антибиотиками, подобный недостаток пытались исправить увеличением концентрации антибиотика в полимере, но на практике отмечалось ухудшение прочностных свойств полимера наряду с возможностью появления токсических [6, 10] и аллергических побочных явлений, связанных с присутствием высоких доз антибиотика в составе такой полимерной композиции. Более того, необходимость увеличения концентрации терапевтического агента, в случае тех же антибиотиков, при ожидаемой неэффективности элиминации патогенной микробиоты также не всегда оправдана, т.к. скорость эмиссии антибиотика из поверхностных слоев такого носителя, как полиметилметакрилат, достаточно велика, и потому ведет к быстрому снижению концентрации антибиотика, что в эксперименте [4] было подтверждено возможностью последующей колонизации такого полимерного имплантата бактериями в течение нескольких суток (72 ч).

Вместе с тем необходимо также объяснить продемонстрированные в настоящем исследовании различные титры использованных бактериофагов в ходе эмиссии во внешнюю среду после их импрегнации в полиметилметакрилат, характеризовавшиеся тем, что стафилококковый

бактериофаг *ph20* фактически утратил эффективный титр уже в течение первых шести суток с момента начала эксперимента, тогда как синегнойный бактериофаг *ph57* сохранял эффективный титр как минимум в течение 13 сут.

Учитывая то, что условия приготовления образцов были идентичными, и исходя из предположения, что в ходе гомогенизации реакционной полимерной смеси полиметилметакрилата с бактериофагом последний попадал как в глубокий, так и в поверхностный слой образца, то одной из возможных причин такого различия в титрах бактериофагов можно предположить плохую переносимость штаммом бактериофага *ph20* контакта с полиметилметакрилатом или иными входящими в состав полимерной композиции веществами либо продуктами реакции полимеризации, способными оказать свое агрессивное воздействие на бактериофаг. В пользу вероятности такой причины может говорить тот факт, что в поданном ранее авторами патенте [11], характеризующем процесс полимеризации полиметилметакрилата с синегнойным бактериофагом *ph57* против *P. aeruginosa*, анализ титров образцов полимера с импрегнированным в него аналогичным способом бактериофагом не сопровождался катастрофическим снижением титра бактериофагов: напротив, были продемонстрированы терапевтические титры, эффективные в отношении целевого микроорганизма. Также дополнительным ограничением исследования могло послужить то, что еще одной возможной причиной нулевых титров бактериофага *ph20* на момент выполнения анализа титра в образцах может быть плохая переносимость использованным штаммом бактериофага *ph20* перепадов температур, которые возникают при охлаждении до +6...+25 °С во время приготовления реакционной смеси и последующем увеличении температуры до +37 °С при помещении образцов в термостат. В этой связи необходимо учитывать возможную подверженность некоторых бактериофагов такого рода агрессивным воздействиям, что может сказаться на выборе пригодных для подобного способа доставки штаммов бактериофагов.

Тем не менее практическая возможность импрегнации бактериофагов в полиметилметакрилат медицинского назначения с поддержанием эффективного титра бактериофага при его эмиссии во внешнюю среду была продемонстрирована как минимум на примере синегнойного бактериофага *ph57*, что открывает пути возможного применения такого способа доставки бактериофагов в клинической практике, например в медицинских учреждениях хирургического профиля, в частности — в травматолого-ортопедических хирургических стационарах.

Ограничения исследования

Авторы не ставили своей целью изучение механических характеристик полиметилметакрилата медицинского назначения, полимеризованного при температуре

в интервале от +6 до +25 °С, при изменении температуры полимеризации и добавлении в реакционную смесь бактериофагов, что было сделано в ходе постановки настоящего экспериментального исследования. Также авторы не учитывали в работе практическую длительность полимеризации до момента полного отвердевания образцов, поскольку в условиях понижения температуры экзотермической реакции полимеризации время отвердевания существенно удлиняется (процесс занимает примерно 45–55 мин) относительно типичного времени отвердевания «костного цемента».

Дополнительным ограничением исследования могла послужить возможная плохая переносимость одним из использованных в эксперименте штаммов бактериофага (в частности *ph20*) перепадов температур, которые возникают при охлаждении до +6...+25 °С во время приготовления реакционной смеси и последующем увеличении температуры до +37 °С при помещении образцов в термостат. Данный факт также рассмотрен в разделе «Обсуждение», и даны рекомендации по учету такого ограничения в практической деятельности.

Заключение

В ходе проведенного экспериментального исследования была подтверждена цель настоящей работы — возможность импрегнации в полиметилметакрилат медицинского назначения бактериофагов вместо антибиотика с сохранением эффективного титра бактериофагов при их эмиссии во внешнюю среду, что позволяет ожидать получения клинически значимых титров бактериофагов при таком способе их доставки в инфекционный очаг и открывает пути возможного практического применения данного способа в клинической практике.

Источник финансирования

Поисковая экспериментальная работа проведена на личные средства авторского коллектива.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Выражение признательности

Авторы выражают признательность Владимиру Евгеньевичу Репину за его помощь на начальном этапе проведения исследования и в работе над патентом.

ЛИТЕРАТУРА

- Skurnik D, Davis MR Jr, Benedetti D, et al. Targeting pan-resistant bacteria with antibodies to a broadly conserved surface polysaccharide expressed during infection. *J Infect Dis.* 2012;205(11):1709–1718. doi: 10.1093/infdis/jis254.
- Самохин А.Г., Козлова Ю.Н., Корнеев Д.В., и др. Современные экспериментальные методы предотвращения бактериальной адгезии и нарушения внутреннего гомеостаза бактерий: обзор литературы // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* — 2017. — №11–2 — С. 248–254.
- [Samokhin AG, Kozlova YuN, Korneev DV, et al. Modern experimental methods of bacterial adhesion prevention and bacterial internal homeostasis impairment: a review. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy.* 2017;(11–2):248–254. (In Russ).]
- Baker AS, Greenham LW. Release of gentamicin from acrylic bone cement. Elution and diffusion studies. *J Bone Joint Surg Am.* 1988;70(10):1551–1557. doi: 10.2106/00004623-198870100-00015.

4. Schiefer UR, Heiss C, Dingeldein E, et al. [Elution kinetics and antimicrobial effects of gentamicin- and clindamycin-loaded bone cements in vitro. (In German).] *Z Orthop Unfall*. 2008;146(1):92–98. doi: 10.1055/s-2007-989301.
5. Wang J, Zhu C, Cheng T, et al. A systematic review and meta-analysis of antibiotic-impregnated bone cement use in primary total hip or knee arthroplasty. *PLoS One*. 2013;8(12):e82745. doi: 10.1371/journal.pone.0082745.
6. Hinarejos P, Guirro P, Puig-Verdie L, et al. Use of antibiotic-loaded cement in total knee arthroplasty. *World J Orthop*. 2015;6(11):877–885. doi: 10.5312/wjo.v6.i11.877.
7. Тикунова Н.В., Власов В.В. Бактериофаги — враги наших врагов // *Наука из первых рук*. — 2013. — №2 — С. 58–69. [Tikunova NV, Vlasov VV. Bakteriofagi — vragi nashikh vragov. *Nauka iz pervykh ruk*. 2013;(2):58–69. (In Russ).]
8. Самохин А.Г., Фёдоров Е.А., Козлова Ю.Н., и др. Применение литических бактериофагов при хирургическом лечении парапротезной инфекции эндопротеза тазобедренного сустава (пилотное исследование) // *Современные проблемы науки и образования*. — 2016. — №6. [Samokhin AG, Fedorov EA, Kozlova YuN, et al. Application of the lytic bacteriophages during surgical treatment of the periprosthetic infection of the hip joint endoprosthesis (pilot study). *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016;(6). (In Russ).]
9. Fenton M, Ross P, McAuliffe O, et al. Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. *Bioeng Bugs*. 2010;1(1):9–16. doi: 10.4161/bbug.1.1.9818.
10. Bunetel L, Segui A, Cormier M, et al. Release of gentamicin from acrylic bone cement. *Clin Pharmacokinet*. 1989;17(4):291–297. doi: 10.2165/00003088-198917040-00006.
11. Патент на изобретение РФ RU 2475273. Козлова Ю.Н., Самохин А.Г., Павлов В.В., Репин В.Е. Способ получения полимерного цемента медицинского назначения. Оpubл. 20.02.2013. [Patent RU №2475273 / 20.02.2013. Byul. №5. Kozlova YuN, Samokhin AG, Pavlov VV, Repin VE. Sposob polucheniya polimernogo tsementa meditsinskogo naznacheniya. (In Russ).] Доступно по: <http://www.freepatent.ru/images/patents/257/2475273/patent-2475273.pdf>. Ссылка активна на 12.12.2017.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Самохин Александр Геннадьевич, старший научный сотрудник лабораторно-экспериментального отдела Новосибирского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России
Адрес: 630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, д. 17, **тел.:** +7 (383) 363-31-31, **e-mail:** motorist@inbox.ru,
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-5599-3925>, **SPIN-код:** 4482-7718

Козлова Юлия Николаевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН
Адрес: 630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, д. 8, **тел.:** +7 (383) 363-51-57, **e-mail:** ulona@ngs.ru,
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-0811-8110>, **SPIN-код:** 2747-9587

Корнеев Денис Владимирович, научный сотрудник лаборатории микроскопических исследований Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Роспотребнадзора
Адрес: 630559, Новосибирская обл., пос. Кольцово, **тел.:** +7 (383) 363-47-00, **e-mail:** korneev_dv@vector.nsc.ru,
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-4350-8317>, **SPIN-код:** 4040-3757

Таранов Олег Святославович, заведующий лабораторией микроскопических исследований Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Роспотребнадзора
Адрес: 630559, Новосибирская обл., пос. Кольцово, **тел.:** +7 (383) 363-47-00, **e-mail:** taranov@vector.nsc.ru,
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-6746-8092>, **SPIN-код:** 5894-6518

Фёдоров Евгений Александрович, врач-ортопед отделения эндопротезирования суставов и осложнений Новосибирского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России
Адрес: 630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, д. 17, **тел.:** +7 (383) 363-31-31, **e-mail:** evgeniifedorov1987@mail.ru,
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-4084-4956>, **SPIN-код:** 9688-8822

Павлов Виталий Викторович, заведующий отделением эндопротезирования суставов и осложнений Новосибирского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России
Адрес: 630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, д. 17, **тел.:** +7 (383) 363-31-31, **e-mail:** pavlovdoc@mail.ru,
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8997-7330>, **SPIN-код:** 7596-2960

Морозова Вера Витальевна, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, **e-mail:** morozova@niboch.nsc.ru,
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-0869-3476>, **SPIN-код:** 4915-9723

Тикунова Нина Викторовна, заведующая лабораторией молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН
Адрес: 630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, д. 8, **тел.:** +7 (383) 363-51-57, **e-mail:** tikunova@niboch.nsc.ru,
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-1687-8278>, **SPIN-код:** 2096-3645