

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Максимова Ю.Г.^{1,2}, Лемкина Л.М.¹, Ионов А.В.³, Никулин С.М.³

ОЦЕНКА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ НА УГЛЕРОД-УГЛЕРОДНЫХ КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛАХ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ЭНДОПРОТЕЗИРОВАНИЯ

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН - филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, 614081, Пермь, Россия;

²ФГОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, 614990, Пермь, Россия;

³АО «Уральский научно-исследовательский институт композиционных материалов», 614014, Пермь, Россия

Для внедрения новых материалов в практику эндопротезирования необходима разработка способов предотвращения развития имплантат-ассоциированной инфекции, связанной с образованием микробных биопленок на поверхности таких имплантатов. Цель работы: разработка методического подхода к оценке биопленкообразования *S. aureus* 25923 ATCC и *S. epidermidis* 29887 ATCC на углерод-углеродных композиционных материалах (УУКМ), перспективных для эндопротезирования, и поиск способов предотвращения формирования биопленок на этих материалах. Биопленкообразование оценивали по изменению оптической плотности раствора при восстановлении соли тетразолия до формазана, осуществляемом дегидрогеназами живых клеток биопленки. Установлено, что на УУКМ за 48 часов формируются биопленки стафилококков при инокуляции этих материалов в питательной среде, причём количество жизнеспособных клеток в биопленке стафилококков на «Углекон-МЯ» достоверно выше, чем на «Углекон-МТ», а электрохимическая обработка этих материалов усиливает процесс биопленкообразования. Разработаны способы предотвращения формирования биопленок стафилококков на этих материалах. Подавление роста биопленки *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC и *S. epidermidis* 29887 ATCC происходит при предобработке УУКМ 5 мг/мл левофлоксацина в течение 24 ч, воздействие 5 мг/мл левофлоксацина в течение 24 часов на 48-часовые биопленки стафилококков приводит к полному её удалению. Антисептик хлоргексидина биглюконат (0,05%) оказывает сильный антибактериальный эффект на биопленку *S. aureus* 25923 ATCC и *S. epidermidis* 29887 ATCC как при предобработке УУКМ в течение 30 минут, так и при 30-минутном воздействии на 48-часовую биопленку *S. aureus* и *S. epidermidis*, выращенную на УУКМ. Кратковременная обработка стерильных УУКМ 0,05% раствором хлоргексидина биглюконата перед их имплантацией значительно снижает вероятность образования биопленки стафилококков и дальнейшей перипротезной инфекции.

Ключевые слова: биопленка; стафилококк; углерод-углеродные композиционные материалы; эндопротезирование; перипротезная инфекция

Для цитирования: Максимова Ю.Г., Лемкина Л.М., Ионов А.В., Никулин С.М. Оценка биопленкообразования на углерод-углеродных композиционных материалах, перспективных для эндопротезирования. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (5): 232-239.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-5-232-239>

Для корреспонденции: Максимова Юлия Геннадьевна, д-р биол. наук, зав. лаб. молекулярной биотехнологии; e-mail: yul_max@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено при финансировании УНИИИКМ в рамках хозяйственного договора с «ИЭГМ УрО РАН» и частично в рамках государственного задания по теме «Биоразнообразие микроорганизмов в антропогенно-загрязнённых экосистемах и функционально-генетические механизмы их адаптации к стрессовым условиям внешней среды», регистрационный номер 124020500028-4.

Поступила 28.02.2024
Принята к печати 12.03.2024
Опубликовано 25.04.2024

Maksimova Yu.G.^{1,2}, Lemkina L.M.¹, Ionov A.V.³, Nikulin S.M.³

ASSESSMENT OF BIOFILM FORMATION ON CARBON-CARBON COMPOSITE MATERIALS PROMISING FOR ENDOPROSTHETICS

¹Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences - branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 614081, Perm, Russia;

²Perm State University, 614990, Perm, Russia;

³Ural Research Institute of Composite Materials, 614014, Perm, Russia

To introduce new materials into the practice of endoprosthetics, it is necessary to develop ways to prevent the development of implant-associated infections associated with the formation of microbial biofilms on the surface of such implants. Objective: development of a methodological approach to assessing the biofilm formation of *S. aureus* 25923 ATCC and *S. epidermidis* 29887 ATCC on carbon-carbon composite materials (CCMs) that are promising for endoprosthetics, and the search for ways to prevent the formation of biofilms on these materials. Biofilm formation was assessed by the change in the optical density of the solution during the reduction of

*tetrazolium salt to formazan, carried out by dehydrogenases of living biofilm cells. It has been established that biofilms of staphylococci are formed on CCCMs within 48 hours when these materials are inoculated in a nutrient medium, and the number of viable cells in the staphylococcal biofilm on «Uglekon-MYa» is significantly higher than on «Uglekon-MT», and the electrochemical treatment of these materials enhances the process biofilm formation. Based on the experiments conducted, methods have been developed to prevent the formation of staphylococcal biofilms on these materials. Suppression of biofilm growth of *S. aureus* 25923 ATCC and *S. epidermidis* 29887 ATCC occurs when CCCMs is pretreated with 5 mg/ml levofloxacin for 24 hours, and exposure of 48-hour staphylococcal biofilms to 5 mg/ml levofloxacin for 24 hours leads to its complete removal. The antiseptic chlorhexidine digluconate (0.05%) has a strong antibacterial effect on *S. aureus* 25923 ATCC and *S. epidermidis* 29887 ATCC biofilms both when pretreated with CCCMs for 30 minutes and after 30 minutes of exposure to a 48-hour staphylococcal biofilm grown on CCCMs. Short-term treatment of sterile CCCMs with a 0.05% chlorhexidine digluconate before implantation will significantly reduce the likelihood of staphylococcal biofilm formation and further periprosthetic infection.*

Key words: biofilm; staphylococcus; carbon-carbon composite materials; endoprosthetics; periprosthetic infection

For citation: Maksimova Yu.G., Lemkina L.M., Ionov A.V., Nikulin S.M. Assessment of biofilm formation on carbon-carbon composite materials promising for endoprosthetics. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; (5): 232-239 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-5-232-239>

For correspondence: Maksimova Yuliya Gennadievna, Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Molecular Biotechnology; e-mail: yul_max@mail.ru

Information about authors:

Maksimova Yu.G., <https://orcid.org/0000-0003-1870-1369>;

Lemkina L.M., <https://orcid.org/0000-0001-8473-771X>;

Ionov A.V., <https://orcid.org/0009-0005-7872-4046>;

Nikulin S.M., <https://orcid.org/0009-0007-9306-081X>.

Conflict of interest. The authors declare absence of conflicts of interests.

Acknowledgment. The study was carried out with funding from UNIKM within the framework of a business agreement with «IEGM Ural Branch of the Russian Academy of Sciences» and partly within the framework of a state assignment on the topic «Biodiversity of microorganisms in anthropogenically polluted ecosystems and functional and genetic mechanisms of their adaptation to stressful environmental conditions», registration number 124020500028-4.

Received 28.02.2024

Accepted 10.03.2024

Published 25.04.2024

Введение. Имплантат-ассоциированная инфекция является одним из самых тяжёлых осложнений эндопротезирования суставов. Следуя данным регистра эндопротезирования коленного сустава ФГБУ «НМИЦ ТО им. Р.Р. Вредена», в 2011-2014 годах доля операций по частичной или полной замене установленного ранее протеза коленного сустава, необходимость проведения которых вызвана развитием глубокой имплантат-ассоциированной инфекции, составила более 59% [1]. Заболеваемость после первичной артропластики составляет примерно 1%, что является наиболее распространённым показателем к ранней ревизии, при этом после ревизионной операции этот показатель ещё выше: около 3% после асептической и 20% после септической ревизии [2]. В России потребность в эндопротезировании составляет до 300 тыс. операций в год. По прогнозам в США к 2030 году будут ежегодно выполнять около 4 млн операций протезирования тазобедренного и коленного суставов [3]. Основываясь на опубликованных данных медицинской статистики США, в настоящее время показатели инфицирования составляют 0,88% при тотальном эндопротезировании бедра и 0,92% при тотальном эндопротезировании коленного сустава, и при сохранении этой тенденции и возрастании количества таких операций в 2030 году, в США случаи инфицирования протезов бедра и колена будут составлять около 37 000 по сравнению с 8300 случаями в 2014 году. Эти данные подчеркивают острую необходимость совершенствования стратегий профилактики и лечения перипротезных инфекций во всем мире, включая ис-

пользование антибактериальных покрытий имплантатов при лечении переломов, первичном и ревизионном эндопротезировании и хирургии опухолей костей [4].

Основными возбудителями инфекционных осложнений после эндопротезирования являются стафилококки. Более 50% перипротезной инфекции тазобедренного или коленного сустава вызваны *Staphylococcus aureus* и *S. epidermidis* [5]. Когда целостность эпителиальных покровов не нарушена, иммунокомпетентный организм успешно противостоит развитию стафилококковых инфекций. В условиях травмы, хирургического стресса, кровопотери и снижения иммунореактивности, которые сопровождают эндопротезирование суставов, условно-патогенные микроорганизмы вызывают развитие гнойно-септических инфекций [6].

В последнее десятилетие представления о патогенезе имплантат-ассоциированной инфекции пересмотрены: главную роль в процессе инфицирования стали отводить способности возбудителя инфекции формировать биоплёнку. В настоящее время биоплёнкообразование рассматривается как основной фактор вирулентности [7]. Бактерии в составе биоплёнок приобретают необычайно высокую устойчивость к неблагоприятным факторам среды. Адгезированные клетки в составе микробных сообществ биоплёнок могут быть до 500 раз более устойчивы, чем суспендированные микроорганизмы, к изменениям pH среды, температуры, солёности, концентрации субстрата, присутствию биоцидов, иммунной защите организма [8]. Из всех инфекций человека до 60% могут быть отнесены к биоплёночным, а любой

чужеродный медицинский имплантат, например, протезы суставов, кардиостимуляторы и катетеры, могут колонизировать прикрепленные бактерии. Это приводит к увеличению случаев заболеваемости и смертности, связанных с биоплёнками [9].

Биомасса биоплёнок иммобилизована на внешней поверхности и внутри пор носителей. Развитие биоплёнки имеет свой цикл, который включает следующие стадии: прикрепление свободных микроорганизмов к поверхности, колонизацию, созревание биоплёнки, её старение и отслойку с расселением клеток. Клеточная адгезия к поверхностям начинается с адсорбции небольших белков и других биомолекул, за которой следует прикрепление клеток [8]. Процесс адгезии бактериальных клеток на абиотическом материале является результатом взаимодействия поверхности бактериальной клетки с поверхностью носителя; на адгезию влияют различные характеристики поверхности, такие как шероховатость, гидрофобность, заряд. Адгезированная биомасса на гидрофобном носителе тем больше, чем выше гидрофобность поверхности микробных клеток [10].

Имплантаты обеспечивают поверхность для образования бактериальной биоплёнки и представляют собой очаг микробного роста. Штаммы стафилококка, выделенные после ультразвуковой обработки удалённых компонентов эндопротезов, и из биоплатов мягких тканей, характеризовались высокой способностью к формированию биоплёнок, достоверно превышающей таковую штаммов, выделенных из поверхностных ран и аспирата [11]. Отмечена зависимость формирования микробной биоплёнки от материала, структуры, рельефа поверхности эндопротеза [12]. *In vitro* подтверждён рост *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* на макропористых сетчатых эндопротезах и формирование биоплёнки в течение 48 часов [13]. Если критически важное время (48 ч) для периоперационной антибиотикопрофилактики будет упущено, дальнейшая борьба с инфекцией становится малоэффективной, так как на имплантате сформируется биоплёнка. В последующем вокруг инфицированного эндопротеза *in vivo* образуется соединительнотканная капсула, а биоплёнка сохраняется [14]. При этом снижается эффективность antimicrobial терапии и активность иммунной системы пациента. При поздних инфекционных осложнениях рекомендуется удаление или замена имплантатов. Одно- или двухэтапная ревизия протезов считается золотым стандартом лечения, поскольку при ней удаляются инфицированные, загрязнённые биоплёнкой имплантаты, а показатели успеха достигаются более чем в 80% случаев. Однако ревизия имплантата, особенно в случае инфекции, несёт в себе большой риск осложнений, таких как повреждение костей и мягких тканей, потеря подвижности и повышенная смертность [15]. Если выполнение хирургического лечения в несколько этапов невозможно, рассматриваются следующие варианты: удаление эндопротеза без его последующей установки, длительная антимикробная терапия, либо ампутация конечности в экстремальных случаях [16].

В контексте растущей заболеваемости инфекциями, вызванными метициллин-резистентным *S. aureus* (MRSA), необходимо разрабатывать новые стратегии снижения уровня инфицирования при эндопротезировании. Предложены различные пути решения этой про-

блемы, например, покрытие поверхности титанового эндопротеза рифампицином и фосфомицином, нанесённое струйной технологией [17], покрытие стального протеза гентамицином путём капельного нанесения из раствора [18], покрытие серебром [4]. Для предотвращения образования биоплёнок и лечения перипротезной инфекции в качестве дополнения к современным концепциям лечения разработано противoinфекционное двухслойное покрытие имплантата с избирательно активируемыми свойствами. На первом этапе поверхность покрывали постоянным слоем поли(L-лактида) с включёнными ионами серебра. На втором этапе нанесли резорбируемый слой триглицеридов с включёнными антибиотиками. Второй слой рассчитан на высвобождение в течение нескольких недель [19].

Кроме обработки антибиотиками, возможна обработка хлоргексидином, обладающим бактерицидным действием. Поглощение хлоргексидина бактериями происходит чрезвычайно быстро: максимальное поглощение происходит в течение 20 секунд, а бактерицидный эффект проявляется немедленно. Такое быстрое действие делает хлоргексидин идеальным антисептиком для интраоперационного лаважа. Чтобы снизить заболеваемость инфекцией протезного сустава, в ряде клиник Европы и США внедряется орошение раствором хлоргексидина цетримида в воде перед закрытием раны после тотального эндопротезирования коленного и тазобедренного сустава [20]. Показано ингибирование роста биоплёнок стафилококков при пропитывании 0,05% раствором хлоргексидина биглюконата хирургической мембраны [21] и сетчатых протезов для герниопластики перед началом имплантации [22].

Большое значение для благоприятного исхода и приживаемости имплантатов имеет материал, из которого он изготовлен. В восстановительной хирургии тазобедренной области используются многочисленные металлические, керамические, полимерные материалы. Металлические медицинские изделия могут подвергаться коррозии, вызывают резорбцию костной ткани, при этом возможно разрушение эндопротеза [23]. Присутствие металлических частиц, высвобождённых из спинальных имплантатов, изготовленных из титанового сплава, может служить причиной позднего воспалительного ответа и боли в зоне оперированного сегмента [24]. Керамические материалы более износоустойчивы, но при этом имеют высокую стоимость и вызывают резорбцию кости при прямом контакте. Полимерные материалы нередко вызывают злокачественные перерождения окружающих тканей, имеют тенденцию к деформации и разрушению. Углеродные материалы перспективны для эндопротезирования в связи с их низкой величиной износа, биосовместимостью, нетоксичностью, способностью стимулировать рост биологической ткани [23]. Однако биосовместимость приводит к тому, что углеродные материалы становятся подходящей подложкой для формирования микробных биоплёнок. Основной задачей для внедрения углеродных материалов в практику эндопротезирования является разработка способов предотвращения биоплёнкообразования на поверхности таких имплантатов, что обуславливает актуальность исследования.

Цель работы - разработка методического подхода к оценке биоплёнкообразования *S. aureus* 25923 ATCC

и *S. epidermidis* 29887 ATCC на углерод-углеродных композиционных материалах, перспективных для эндопротезирования, и поиск способов предотвращения формирования биоплёнок на этих материалах.

Материал и методы. Использованы коллекционные штаммы *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC и *Staphylococcus epidermidis* 29887 ATCC и образцы углерод-углеродных композиционных материалов (УУКМ): «Углекон-МТ» (ТУ 23.99.14-092-07523132-2021) и «Углекон-МЯ» (ТУ 23.99.14-067-07523132-2016) до и после электрохимической обработки. «Углекон-МЯ» представляет собой углерод-углеродный материал с однородной пористой структурой на поверхности и срезе, изготавливается из полимерных композиционных материалов с дальнейшей термохимической обработкой до достижения необходимой плотности. «Углекон-МЯ» может применяться в качестве костезамещающего имплантата. Данный материал хорошо совместим с костной тканью, размеры его пор позволяют образовывать структуру кость-композит, что делает возможным встраивать его в качестве участка кости, удалённой вследствие травм или заболеваний. «Углекон-МТ» - углерод-углеродный композиционный материал, армированный тканью на основе углеродного волокна. Планируется к использованию в качестве материала имплантатов для краниопластики и чашки эндопротеза тазобедренного сустава. Электрохимическую обработку (ЭХО) образцов проводили в растворе NH_4HCO_3 . Вид обработки - анодный, напряжение 8 В, время обработки 15 минут, плотность тока 0,05-0,07 А/м².

S. aureus 25923 ATCC и *S. epidermidis* 29887 ATCC выращивали на питательной среде Лурия-Бертани (LB) при 37 °С в течение 16-18 часов, разводили этой же средой до ОП=0,015 (10⁷ КОЕ/мл) и использовали как инокулум, который разливали по 3 мл в стерильные стеклянные флаконы с крышками. В каждый флакон помещали по одному образцу УУКМ в виде кубика. Флаконы инкубировали в термостате при 37 °С в течение 48 часов. Через двое суток образцы УУКМ переносили в другие стерильные флаконы и дважды отмывали от планктонной культуры 0,01 М фосфатным буфером (рН=7,2). Оставшуюся в образцах жидкость удаляли, выдерживая их в течение 10-15 минут на фильтровальной бумаге в стерильных условиях. Контрольные образцы подвергали всем вышеописанным манипуляциям, но вместо инокулюмов стафилококков использовали стерильную среду LB.

Жизнеспособность клеток биоплёнок выявляли по степени восстановления 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2-Н-тетразолия бромид (МТТ, Servicebio, Китай) до водонерастворимого формазана с последующей экстракцией последнего ДМСО по прописи фирмы-производителя. Оптическую плотность окрашенных экстрактов измеряли на спектрофотометре (PD 303, Япония) при 490 нм. Полученные результаты выражали в условных единицах величины оптической плотности, делённой на площадь образца.

Чувствительность к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом согласно «Методическим указаниям МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

Предобработку УУКМ левофлоксацином (РУП

«Белмедпрепараты, Беларусь») проводили следующим образом. Образцы УУКМ помещали в лунки 48-луночного стерильного пластикового планшета (Nunc, Дания) и заливали 1 мл готового к употреблению раствора левофлоксацина (5 мг/мл) на 24 ч при комнатной температуре (22-24 °С). К контрольному образцу вместо раствора антибиотика добавляли стерильный физраствор (0,9% NaCl). Через сутки образцы из лунок подсушивали на фильтровальной бумаге и переносили в индивидуальные стерильные стеклянные флаконы с 3 мл инокулума *S. aureus* 25923 ATCC или *S. epidermidis* 29887 ATCC, содержащих 10⁷ КОЕ/мл. Биоплёнки выращивали при 37 °С в течение 48 часов. По истечении времени инкубации образцы дважды отмывали от клеток планктонной культуры 0,01 М фосфатным буфером (рН 7,2), подсушивали с помощью фильтровальной бумаги и помещали в лунки нового стерильного 48-луночного планшета для окрашивания клеток биоплёнок тетразолием (МТТ) по прописи фирмы-производителя (Servicebio, Китай) в течение ночи. Образцы переносили в 24-луночные планшеты (SPL Life Sciences Co., Корея), заливали 1-2 мл ДМСО для растворения кристаллов формазана. Интенсивность окрашивания, пропорционального количеству жизнеспособных клеток, измеряли на спектрофотометре PD-303 (Япония) при 490 нм и выражали в условных единицах оптической плотности, делённой на площадь образца.

Влияние левофлоксацина на эрадикацию биоплёнок изучали следующим образом. На стерильных образцах УУКМ выращивали биоплёнки *S. aureus* 25923 ATCC или *S. epidermidis* 29887 ATCC в течение 48 ч по описанной выше методике. После отмывки биоплёнок от планктонных клеток и удаления остатков промывочного буфера с помощью фильтровальной бумаги образцы переносили в лунки 48-луночного стерильного планшета (Nunc, Дания) и заливали 1 мл раствора левофлоксацина (5 мг/мл) на сутки при комнатной температуре. В лунки с контрольными образцами вносили вместо антибиотика по 1 мл стерильного физиологического раствора (0,9% раствор NaCl). По истечении указанного времени растворы удаляли, образцы подсушивали и переносили в другой стерильный планшет для окрашивания живых клеток биоплёнок реактивом МТТ с последующей экстракцией ДМСО образовавшегося формазана и спектрофотометрической детекцией интенсивности окраски по описанной выше методике.

Антисептический эффект хлоргексидина биглюконата на биоплёнки стафилококков оценивали следующим образом. Предобработку УУКМ 0,05% раствором «Хлоргексидин биглюконат» (ООО «Экотекс» Россия) проводили в течение 30 минут в лунках стерильного 48-луночного пластикового планшета, после чего образцы УУКМ использовали в качестве носителей для выращивания биоплёнок стафилококков. Исследовали 30-минутное антибактериальное действие хлоргексидина на выращенные в течение 48 часов и отмывтые биоплёнки стафилококков. Отмывку УУКМ, окрашивание и детекцию окраски выполняли, как описано ранее.

Полученные данные являются результатами не менее чем трёх независимых опытов. При статистической

обработке определяли среднее арифметическое, стандартное отклонение, стандартную ошибку среднего. Достоверность различий определяли с использованием критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. При изучении биоуплёнообразования

S. aureus 25923 АТСС и *S. epidermidis* 29887 АТСС на УУКМ установлено, что количество жизнеспособных клеток стафилококков на материале «Углекон-МЯ» достоверно выше, чем на «Углекон-МТ», а электрохимическая обработка этих УУКМ усиливает процесс биоуплёнообразования (табл. 1).

Таблица 1

Оценка количества жизнеспособных клеток в 48-часовых биоуплёнках стафилококков при окрашивании реактивом МТТ (ОП₅₇₀/см²)

УУКМ	<i>S. aureus</i> 25923 АТСС		<i>S. epidermidis</i> 29887 АТСС	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
«Углекон-МТ»	0,01	0,080±0,007	0,01	0,05±0,002
«Углекон-МТ»-ЭХО	0,01	0,14±0,08**	0,01	0,090±0,007**
«Углекон-МЯ»	0,04	0,180±0,03*	0,03	0,11±0,01*
«Углекон-МЯ»-ЭХО	0,04	0,24±0,05**	0,03	0,2±0,03**

Примечание. * - $p < 0,05$ - биоуплёнообразование на «Углекон-МЯ» по отношению к таковому на «Углекон-МТ»; ** - $p < 0,05$ - биоуплёнообразование на УУКМ с ЭХО по отношению к таковому на УУКМ без обработки.

Для выбора препарата из большого количества современных антибиотиков проверена чувствительность используемых штаммов стафилококков к 16 современным антибактериальным агентам, используемым в клинической практике для лечения стафилококковых инфекций. Среди изученных препаратов *S. aureus* 25923 АТСС и *S. epidermidis* 29887 АТСС обладали наибольшей чувствительностью к таким антибиотикам, как ципрофлоксацин, клиндамицин, левофлоксацин, фузидиевая кислота, доксициллин, рифампицин, новобиоцин. Учитывая интенсивность действия антибиотиков и биодоступность готовых лекарственных форм, для экспериментов выбран левофлоксацин, который давал зоны ингибирования роста *S. aureus* 25923 АТСС и *S. epidermidis* 29887 АТСС, равные 23 и 26 мм соответственно. Определены минимальные ингибирующие концентрации (МИК) для планктонных культур стафилококков. МИК левофлоксацина для обоих штаммов

стафилококков равна 0,6 мкг/мл. Известно, что чувствительность биоуплёнок микроорганизмов к антибиотикам в разы меньше, чем у планктонных культур. Для определения концентрации левофлоксацина, которая будет эффективна в отношении биоуплёнок *S. aureus* и *S. epidermidis*, выполнены эксперименты на биоуплёнках стафилококков, выращенных в иммунологических полистероловых 96-луночных планшетах. Установлено, что для обработки УУКМ необходимо использовать левофлоксацин в концентрации 5 мг/мл.

Изучено влияние 5 мг/мл левофлоксацина на образование биоуплёнок стафилококков на УУКМ. Проведена 24-часовая предобработка УУКМ левофлоксацином (5 мг/мл). Показано, что такая предобработка достоверно угнетает процессы биоуплёнообразования *S. aureus* 25923 АТСС и *S. epidermidis* 29887 АТСС на этих материалах (табл. 2). Меньшая продолжительность воздействия антибиотика не давала положительного результата.

Таблица 2

Влияние 24-часовой предобработки УУКМ левофлоксацином на образование биоуплёнок стафилококков (ОП₅₇₀/см²)

УУКМ	<i>S. aureus</i> 25923 АТСС		<i>S. epidermidis</i> 29887 АТСС	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
«Углекон-МТ»	0,06	0,030±0,003*	0,05	0,030±0,001
«Углекон-МТ»-ЭХО	0,12	0,02±0,00*	0,1	0,010±0,001*
«Углекон-МЯ»	0,15	0,030±0,002*	0,11	0,030±0,002*
«Углекон-МЯ»-ЭХО	0,21	0,050±0,003*	0,25	0,050±0,002*

Примечание. * - $p < 0,05$ по отношению к контролю без воздействия антибиотика.

Биоуплёнки стафилококков выращены на УУКМ в течение 48 часов, затем на выращенные биоуплёнки воздействовали левофлоксацином (5 мг/мл) в течение 24 часов. Показано достоверное разрушение двусуточных биоуплёнок *S. aureus* 25923 АТСС и *S. epidermidis* 29887 АТСС (табл. 3). Меньшая продолжительность воздействия антибиотика не давала положительного результата.

Предобработку образцов 0,05% раствором

«Хлоргексидин биглюконат» проводили в течение 30 мин, после чего инокулировали УУКМ суспензией штаммов стафилококков согласно методике (табл. 4). Во втором варианте опытов 48-часовые биоуплёнки *S. aureus* и *S. epidermidis* обрабатывали хлоргексидином в течение 30 минут (табл. 5). В обоих вариантах антисептик хлоргексидин проявлял сильный антибактериальный эффект при 30-минутной обработке.

Таблица 3

Действие левофлоксацина на 48-часовые биоплёнки стафилококков на УУКМ (ОП₅₇₀/см²)

УУКМ	<i>S. aureus</i> 25923 ATCC		<i>S. epidermidis</i> 29887 ATCC	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
«Углекон-МТ»	0,07	0,01±0,001*	0,03	0,010±0,001*
«Углекон-МТ»-ЭХО	0,13	0,01±0,001*	0,08	0,0080±0,0001*
«Углекон-МЯ»	0,16	0,02±0,002*	0,12	0,030±0,001*
«Углекон-МЯ»-ЭХО	0,22	0,05±0,003*	0,20	0,050±0,003*

Примечание. * - $p < 0,05$ по отношению к контролю без воздействия антибиотика.

Таблица 4

Влияние 30-минутной предобработки хлоргексидином биглюконатом (0,05%) на образование биоплёнок стафилококков на УУКМ (ОП₅₇₀/см²)

УУКМ	<i>S. aureus</i> 25923 ATCC		<i>S. epidermidis</i> 29887 ATCC	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
«Углекон-МТ»	0,06	0,01±0,00*	0,06	0,013±0,001*
«Углекон-МТ»-ЭХО	0,13	0,014±0,002*	0,13	0,013±0,000*
«Углекон-МЯ»	0,11	0,035±0,001*	0,14	0,027±0,001*
«Углекон-МЯ»-ЭХО	0,19	0,032±0,003*	0,20	0,036±0,001*

Примечание. * - $p < 0,05$ по отношению к контролю без воздействия хлоргексидина.

Таблица 5

Влияние 30-минутной обработки хлоргексидином биглюконатом (0,05%) 48-часовых биоплёнок стафилококков на УУКМ (ОП₅₇₀/см²)

УУКМ	<i>S. aureus</i> 25923 ATCC		<i>S. epidermidis</i> 29887 ATCC	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
«Углекон-МТ»	0,09	0,01±0,00*	0,05	0,01±0,00*
«Углекон-МТ»-ЭХО	0,14	0,01±0,001*	0,12	0,01±0,00*
«Углекон-МЯ»	0,15	0,02±0,002*	0,16	0,020±0,001*
«Углекон-МЯ»-ЭХО	0,26	0,03±0,001*	0,24	0,03±0,00*

Примечание. * - $p < 0,05$ по отношению к контролю без воздействия хлоргексидина.

Обсуждение. Предложен методический подход, позволяющий оценить содержание жизнеспособных клеток в бактериальной биоплёнке, выращенной на углеродном материале. В отличие от окраски биоплёнки кристаллическим фиолетовым с последующей экстракцией красителя этиловым спиртом и определением оптической плотности раствора [25], позволяющей оценить общую биомассу биоплёнки, окраска солями тетразолия выявляет живые метаболизирующие клетки [26]. Соли тетразолия восстанавливаются до окрашенного соединения формазана дегидрогеназами живой клетки. Этот метод не только более точен для определения жизнеспособных клеток, но и является предпочтительным для оценки биоплёнокообразования на подобных углеродных материалах, связывающих за счёт пористой структуры значительное количество кристаллического фиолетового даже в отсутствие биоплёнки.

Бактерии в составе биоплёнки значительно более устойчивы к действию биоцидов, чем в планктонном состоянии. МИК левофлоксацина для *S. aureus* 25923 ATCC и *S. epidermidis* 29887 ATCC возрастает с 0,6 мкг/мл для планктонных клеток до 5 мг/мл для биоплёнки. Полного удаления выращенной биоплёнки стафилококков и предотвращение её роста на УУКМ добивались только при инкубации материалов с антибиотиком

в течение 24 часов. Длительная инкубация материала в антибиотике нежелательна, в связи с чем протестирован недорогой и общедоступный антисептик хлоргексидин. 30-минутная инкубация в 0,05% коммерчески доступном растворе хлоргексидина биглюконата приводила к полной эрадикации выращенной 48-часовой биоплёнки стафилококков и предотвращению её образования при инокуляции материала. Данный способ может быть рекомендован для предобработки УУКМ, предлагаемых в качестве материала для изготовления костезамещающего имплантата человека и животных.

Заключение. Методический подход, основанный на окраске бактериальных биоплёнок солями тетразолия, является предпочтительным для оценки биоплёнокообразования на УУКМ по сравнению с общепринятым способом окраски биоплёнок кристаллическим фиолетовым, поскольку позволяет оценить содержание жизнеспособных клеток, а не общую биомассу биоплёнки. Краситель на основе солей тетразолия не связывается с пористой поверхностью УУКМ в отсутствие биоплёнки. Количество жизнеспособных клеток в биоплёнке *S. aureus* 25923 ATCC и *S. epidermidis* 29887 ATCC на «Углекон-МЯ» достоверно выше, чем на «Углекон-МТ», электрохимическая обработка этих УУКМ усиливает процесс биоплёнокообразования. Левофлоксацин

(5 мг/мл) подавляет биоплёнкообразование *S. aureus* 25923 ATCC и *S. epidermidis* 29887 ATCC на УУКМ при предобработке материала в течение 24 часов. Воздействие 5 мг/мл левофлоксацина в течение 24 ч на 48-часовые биоплёнки стафилококков приводит к полной эрадикации биоплёнки. Антисептик хлоргексидина биглюконат (0,05%) оказывает сильный антибактериальный эффект на биоплёнки *S. aureus* 25923 ATCC и *S. epidermidis* 29887 ATCC как при предобработке УУКМ в течение 30 минут, так и при 30-минутном воздействии на 48-часовую биоплёнку. Кратковременная обработка стерильных УУКМ 0,05% раствором хлоргексидина биглюконата перед их имплантацией значительно снижает вероятность образования биоплёнки стафилококков и дальнейшей перипротезной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 2, 4, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17-20, 25, 26 СМ. REFERENCES)

- Преображенский П.М., Каземирский А.В., Гончаров М.Ю. Современные взгляды на диагностику и лечение пациентов с перипротезной инфекцией после эндопротезирования коленного сустава. *Гений ортопедии*. 2016; 3: 94-10.
- Мурылев В., Куковенко Г., Елизаров П., Рукин Я., Цыгин Н. Перипротезная инфекция при эндопротезировании тазобедренного сустава. *Врач*. 2018; 29(3): 17-22.
- Джумабеков С.А., Айтназаров Э.Т., Казаков С.К., Болоткан уулу Н., Кельдибеков Ч.Ж. Бактериологический анализ инфекционных осложнений эндопротезирования коленного сустава. *Вестник Кыргызско-Российского Славянского университета*. 2017; 17(10): 29-31.
- Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития. *Генетика*. 2004; 40(11): 1189-98.
- Максимова Ю.Г., А.Ю. Максимов, Демаков В.А. Адгезия бактериальных клеток на углеродных носителях: характеристики процесса и применение в биотехнологии. *Вестник Пермского федерального исследовательского центра*. 2019; 3: 86-93.
- Бабушкина И.В., Бондаренко А.С., Мамонова И.А., Ульянов В.Ю. Образование биопленок штаммами стафилококка, выделенными из различного биологического материала при инфекционных осложнениях тотального эндопротезирования коленного сустава. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2019; 15(2): 261-6.
- Паршиков В.В., Чеботарь И.В., Ходак В.А., Самсонов А.А. Исследование *in vitro* микробной биоплёнки на поверхности синтетических макропористых эндопротезов для пластики брюшной стенки. *Современная технологическая медицина*. 2012; 1. Доступно на: <https://cyberleninka.ru/article/n/issledovanie-in-vitro-mikrobnoy-biopenki-na-poverhnosti-sinteticheskikh-makroporistykh-endoprotezov-dlya-plastiki-bryushnoy-stenki> (дата обращения: 22.11.2023).
- Винклер Т., Трампуш А., Ренц Н., Перка К., Божкова С.А. Классификация и алгоритм диагностики и лечения перипротезной инфекции тазобедренного сустава. *Травматология и ортопедия России*. 2016; (1):33-45.
- Кузнецова М.В., Кузнецова М.П., Афанасьевская Е.В., Самарцев В.А. Экспериментальное обоснование использования противоспаечного барьера на основе коллагена в комбинации с биоцидами в условиях абдоминальной хирургической инфекции. *Современные технологии в медицине*. 2018; 10(2): 66-75.
- Самарцев В.А., Гаврилов В.А., Паршаков А.А., Кузнецова М.В. Профилактика раневых инфекционных осложнений после герниопластики сетчатыми протезами: экспериментально-клиническое исследование. *Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал им. акад. Б.В. Петровского*. 2020; 8(1): 12-21.
- Золкин П.И., Кавалерский Г.М., Серeda А.П., Аберяхимов Х.М., Алтуфьев А.В., Бережнова А.А. Углеродный эндопротез тазобедренного сустава. *Журнал клинической и экспериментальной ортопедии им. Г.А. Илизарова*. 2015; 2: 32-5.
- Пашкевич Л.А., Мазуренко А.Н., Мохаммади М.Т. Морфологическая характеристика перимплантных тканей при вентральном спондилезде позвоночника. *Медицинские новости*. 2020; 11(314). Доступно на: <https://cyberleninka.ru/article/n/morfologicheskaya-harakteristika-periimplantnyh-tkaney-pri-ventralnom-spondilodeze-spozvonochnika> (дата обращения: 22.11.2023).

REFERENCES

- Preobrazhenskiy P.M., Kazemirskiy A.V., Goncharov M.Yu. Current views on the diagnosis and treatment of patients with periprosthetic infection after knee replacement. *Geniy ortopedii*. 2016; 3: 94-10. (in Russian)
- Hamilton T., Palmer A., Kendrick B., Alvand A. Prosthetic joint infection in the hip and knee. *Orthopaedics and Trauma*. 2023; 37(6): 353-8.
- Murylev V., Kukovenko G., Elizarov P., Rukin Ya., Cygin N. Periprosthetic infection during hip replacement. *Vrach*. 2018; 29(3): 17-22. (in Russian)
- Alt V. Antimicrobial coated implants in trauma and orthopaedics – A clinical review and risk-benefit analysis. *Injury. Int. J. Care Injured*. 2017; 48: 599-607.
- Malchau K.S., Tillander J., Zaborowska M., Hoffman M., Lasa I., Thomsen P., Malchau H., Rolfson O., Trobos M. Biofilm properties in relation to treatment outcome in patients with first-time periprosthetic hip or knee joint infection. *J. Orthop. Translat*. 2021; 30: 31-40.
- Dzhumabekov S.A., Aytazarov Je.T., Kazakov S.K., Bolotkan uulu N., Kel'dibekov Ch.Zh. Bacteriological analysis of infectious complications of knee replacement. *Vestnik Kyrgyzsko-Rossiyskogo Slavyanskogo universiteta*. 2017; 17(10): 29-31. (in Russian)
- Il'ina T.S., Romanova Yu.M., Ginzburg A.L. Biofilms as a way of existence of bacteria in the environment and the host organism: phenomenon, genetic control and systems for regulating their development. *Genetika*. 2004; 40(11): 1189-98. (in Russian)
- Al-Amshawee S., Yunus M.Y.B.M., Lynam J.G., Lee W.H., Dai F., Dakhil I.H. Roughness and wettability of biofilm carriers: A systematic review. *Environ. Technol. Innovation*. 2021; 21: 101233.
- Toté K., Berghe D.V., Deschacht M., de Wit K., Maes L., Cos P. Inhibitory efficacy of various antibiotics on matrix and viable mass of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2009; 33(6): 525-31.
- Maksimova Yu.G., Maksimov A.Yu, Demakov V.A. Adhesion of bacterial cells on carbon carriers: process characteristics and application in biotechnology. *Vestnik Permskogo federal'nogo issledovatel'skogo tsentra*. 2019; 3: 86-93. (in Russian)
- Babushkina I.V., Bondarenko A.S., Mamonova I.A., Ul'janov V.Ju. Formation of biofilms by staphylococcus strains isolated from various biological materials during infectious complications of total knee replacement. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal*. 2019; 15(2): 261-6. (in Russian)
- Aydinuraz K., Apalar C., Apalar F. *In vitro* *S. epidermidis* and *S. aureus* adherence to composite and lightweight polypropylene grafts. *J. Surg. Res*. 2009; 157(1): 79-86.
- Parshikov V.V., Chebotar' I.V., Hodak V.A., Samsonov A.A. In vitro study of microbial biofilm on the surface of synthetic macroporous endoprostheses for abdominal plastic surgery. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2012; 1. Available at: <https://cyberleninka.ru/article/n/issledovanie-in-vitro-mikrobnoy-biopenki-na-poverhnosti-sinteticheskikh-makroporistykh-endoprotezov-dlya-plastiki-bryushnoy-stenki> (accessed 11.22.2023). (in Russian)
- Buret A., Ward K.H., Olson M.E., Costerton J.W. An in vivo model to study the pathobiology of infectious biofilms on biomaterial surfaces. *J. Biomed. Mater. Res*. 1991; 25(7): 865-74.
- Rahardja R., Zhu M., Davis J.S., Manning L., Metcalf S., Young S.W. Success of debridement, antibiotics, and implant retention in prosthetic joint infection following primary total knee arthroplasty: results from a prospective multicenter study of 189 cases. *J. Arthroplasty*. 2023; 38: S399e-S404.
- Vinkler T., Trampush A., Rents N., Perka K., Bozhkova S.A. Classification and algorithm for diagnosis and treatment of periprosthetic infection of the hip joint. *Travmatologiya i ortopediya Rossii*. 2016;

- (1): 33-45. (in Russian)
17. Alt V., Kirchhof K., Seim F., Hrubesch I., Lips K.S., Mannel H., Domann E., Schnettler R. Rifampicin–fosfomycin coating for cementless endoprostheses: Antimicrobial effects against methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Acta Biomaterialia*. 2014; 10: 4518-24.
 18. Alt V., Bitschnau A., Osterling J., Sewing A., Meyer C., Kraus R., Meissner S.A., Wenisch S., Domann E., Schnettler R. The effects of combined gentamicin–hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses on the reduction of infection rates in a rabbit infection prophylaxis model. *Biomaterials*. 2006; 27: 4627-34.
 19. Schulze M., Fobker M., Puetzler J., Hillebrand J., Niemann S., Schulte E., Kurzynski J., Gosheger G., Hasselmann J. Mechanical and microbiological testing concept for activatable anti-infective biopolymer implant coatings. *Biomater. Adv.* 2022; 138: 212917.
 20. Willigenburg N.W., Yesilkaya F., Rutgers M., Moojen D.J.F., Poolman R.W., Kempen D.H.R. Prosthetic joint infection and wound leakage after the introduction of intraoperative wound irrigation with a chlorhexidine-cetrimide solution: a large-scale before-after study. *Arthroplasty Today*. 2023; 19: 101053.
 21. Kuznetsova M.V., Kuznetsova M.P., Afanas'evskaya E.V., Samartsev V.A. Experimental substantiation of the use of an anti-adhesion barrier based on collagen in combination with biocides in conditions of abdominal surgical infection. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2018; 10(2): 66-75. (in Russian)
 22. Samartsev V.A., Gavrilov V.A., Parshakov A.A., Kuznetsova M.V. Prevention of wound infectious complications after hernioplasty with mesh prostheses: experimental clinical study. *Klinicheskaya i eksperimental'naya khirurgiya. Zhurnal im. akad. B.V. Petrovskogo*. 2020; 8(1): 12-21. (in Russian)
 23. Zolkin P.I., Kavalerskiy G.M., Sereda A.P., Aberjahimov H.M., Altuf'ev A.V., Berezhnova A.A. Carbon endoprosthesis of the hip joint. *Zhurnal klinicheskoy i eksperimental'noy ortopedii im. G.A. Ilizarova*. 2015; 2: 32-5. (in Russian)
 24. Pashkevich L.A., Mazurenko A.N., Mohammadi M.T. Morphological characteristics of peri-implant tissues during anterior spinal fusion. *Meditsinskie novosti*. 2020; 11(314). Available at: <https://cyberleninka.ru/article/n/morfologicheskaya-harakteristika-periimplantnyh-tkaney-pri-ventralnom-spondilodeze-pozvonochnika> (accessed 22.11.2023). (in Russian)
 25. O'Toole, G.A. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.* 2011; 47: 2437.
 26. Kidon S., Miseon P., Jungwhan C., Saeed K. Methods to grow and measure in vitro static biofilms. In: *Encyclopedia of Infection and Immunity*. Rezaei N., 4th ed.: 408-29. Oxford: Elsevier; 2022.