



Научная статья
УДК 616-022-08:616-74
<https://doi.org/10.21823/2311-2905-2021-27-2-54-64>

Влияние комбинации ванкомицина с препаратом серебра на длительность антимикробной активности костного цемента и формирование биопленки штаммом MRSA

С.А. Божкова¹, Е.М. Гордина¹, М.А. Марков², А.В. Афанасьев¹, В.А. Артюх¹,
К.В. Малафеев³, Е.М. Иванькова^{3,4}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет)», г. Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», г. Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБОУН «Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук», г. Санкт-Петербург, Россия

Реферат

Актуальность. Локальная профилактика перипротезной инфекции и лечение инфекционных осложнений после протезирования различных суставов включает применение спейсеров на основе полиметилметакрилата, импрегнированных антимикробными средствами. Вносимые компоненты способны изменять характеристики костного цемента и оказывать антимикробное действие различной длительности. **Цель исследования** — оценить длительность антимикробной активности и влияние на формирование биопленки MRSA ATCC 43300 образцов костного цемента с гентамицином, импрегнированных ванкомицином и/или высокодисперсным серебром. **Материал и методы.** Образцы готовили из костного цемента DePuy CMW 1 Gentamicin и смешивали с ванкомицином и/или высокодисперсным серебром. Элементный состав исследовали методами сканирующей электронной микроскопии и микрорентгеноспектрального анализа. Изучение длительности антимикробной активности выполняли путем нанесения суточного инкубационного раствора с образцами на поверхность бактериального газона. Оценка влияния на биопленкообразование осуществляли путем погружения тестируемых образцов в LB-бульон с MRSA. **Результаты.** Контрольные образцы не обладали антимикробной активностью (АМА) в отношении MRSA ATCC 43300. Опытные образцы, дополнительно содержащие 10 масс.% ванкомицина, были эффективны в течение 9 суток. При добавлении высокодисперсного серебра регистрировали удлинение времени активности образцов. Так, при внесении 2,5 масс.% высокодисперсного серебра длительность АМА составила 21 сут., а при увеличении до 10 масс.% — 34 сут. Энергодисперсионный анализ поверхности образца с 10 масс.% ванкомицина и высокодисперсного серебра показал, что в структуре скелетного типа присутствует матричный компонент на основе сульфата бария с включениями серебра. При изучении влияния образцов на биопленкообразование типového штамма не выявлено статистически значимых различий между оптической плотностью экстрактов генцианвиолета в отрицательном контроле и в среде с MRSA. **Заключение.** Комбинация ванкомицина с высокодисперсным серебром пролонгировала антимикробную активность образцов в отношении MRSA ATCC 43300 и препятствовала формированию микробных биопленок на его поверхности. Несмотря на то, что условия проведенного эксперимента *in vitro* не являются тождественными условиям клинического применения антимикробных спейсеров из костного цемента, полученные нами результаты свидетельствуют о необходимости применять спейсеры с известной продолжительностью антимикробной активности и соблюдать сроки замены временных конструкций.

Ключевые слова: перипротезная инфекция, биопленкообразование, MRSA, костный цемент, серебро, ванкомицин.

Источник финансирования: государственное бюджетное финансирование.

Божкова С.А., Гордина Е.М., Марков М.А., Афанасьев А.В., Артюх В.А., Малафеев К.В., Иванькова Е.М. Влияние комбинации ванкомицина с препаратом серебра на длительность антимикробной активности костного цемента и формирование биопленки штаммом MRSA. *Травматология и ортопедия России*. 2021;27(2):54-64. <https://doi.org/10.21823/2311-2905-2021-27-2-54-64>.

Cite as: Bozhkova S.A., Gordina E.M., Markov M.A., Afanasyev A.V., Artyukh V.A., Malafeev K.V., Ivan'kova E.M. [The Effect of Vancomycin and Silver Combination on the Duration of Antibacterial Activity of Bone Cement and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Biofilm Formation]. *Travmatologiya i ortopediya Rossii* [Traumatology and Orthopedics of Russia]. 2021;27(2):54-64. (In Russian). <https://doi.org/10.21823/2311-2905-2021-27-2-54-64>.

Гордина Екатерина Михайловна / Ekaterina M. Gordina; e-mail: emgordina@win.niito.ru

Рукопись поступила/Received: 30.04.2021. Принята в печать/Accepted for publication: 04.06.2021.

© Божкова С.А., Гордина Е.М., Марков М.А., Афанасьев А.В., Артюх В.А., Малафеев К.В., Иванькова Е.М., 2021

The Effect of Vancomycin and Silver Combination on the Duration of Antibacterial Activity of Bone Cement and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation

Svetlana A. Bozhkova¹, Ekaterina M. Gordina¹, Mikhail A. Markov², Alexander V. Afanasyev¹, Vasily A. Artyukh¹, Konstantin V. Malafeev³, Elena M. Ivan'kova^{3,4}

¹ Vreden National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics, St. Petersburg, Russia

² Saint-Petersburg State Institute of Technology, St. Petersburg, Russia

³ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

⁴ Institute Of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

Abstract

Background. Local prevention of periprosthetic infection and treatment of infectious complications after various joints arthroplasties includes the use of polymethylmethacrylate-based spacers impregnated with antimicrobial agents. At the same time, the added components are able to change the bone cement characteristics and have variable antimicrobial effect duration. **The aim of the study** was to evaluate the duration of antimicrobial activity and the effect on the MRSA ATCC 43300 biofilm formation on bone cement samples with gentamycin impregnated with vancomycin and/or highly dispersed silver. **Materials and Methods.** Samples were made from bone cement DePuy CMW 1 Gentamicin and mixed with vancomycin and/or highly dispersed silver. The elemental composition was studied by scanning electron microscopy and micro-X-ray spectral analysis. The study of the antimicrobial activity duration was performed by daily applying an incubation solution with samples to the bacterial lawn surface. The effect on biofilm formation was evaluated by immersing the test samples in LB-broth with MRSA. **Results.** The control samples did not have antimicrobial activity (AMA) against MRSA ATCC 43300. Test samples, additionally containing 10 wt.% of vancomycin was effective for 9 days. When adding highly dispersed silver, the lengthening of the samples activity time was recorded. So, when applying 2 .5 wt.% of highly dispersed silver, the duration of AMA was 21 days, and when increased to 10 wt.% — 34 days. Energy-dispersion analysis of the sample surface with 10 wt.% of vancomycin and highly dispersed silver showed that the skeletal structure type contains matrix component based on barium sulfate with silver inclusions. During the study of the samples effect on a typical strain biofilm formation, no statistically significant differences were found between the optical density of gentian violet extracts in the negative control and in the medium with MRSA. **Conclusion.** The vancomycin with highly dispersed silver combination prolonged the antimicrobial activity of the samples against MRSA ATCC 43300 and effectively prevented the formation of microbial biofilms on its surface. Despite the fact that the conditions of the conducted experiment in vitro are not identical to the conditions of bone cement antimicrobial spacers clinical use, our results indicate the need to use spacers with a known duration of antimicrobial activity and to comply with the terms of temporary structures replacement.

Key words: periprosthetic joint infection, biofilm formation, MRSA, bone cement, silver, vancomycin.

Funding: state budgetary funding.

Введение

Существование микробов в виде биопленок является естественным процессом, обеспечивающим их выживание. Биопленки образованы микробными сообществами, которые встроены в самостоятельно продуцируемую матрицу внеклеточных полимерных веществ (extracellular polymeric substances) [1]. Матрикс, в свою очередь, объединяет бактериальные клетки в единую систему и выполняет структурно-образующую функцию [2].

Бактериальные биопленки являются значительной проблемой хирургов в лечении инфекций, связанных с имплантатами, поэтому удаление

биопленок с имплантата и связанной с ним некротической ткани имеет первостепенное значение для успешной санации микробного очага [2]. Более того, достаточная концентрация антибиотиков при системном введении препаратов или применении местной антибиотикотерапии позволяют осуществить эрадикацию планктонных форм возбудителей, однако этого недостаточно в отношении микрокластеров, остающихся после удаления биопленок [3]. Рассеивание биопленочных микроорганизмов позволяет персистировать источнику бактериальной популяции, устойчивой к различным антимикробным агентам, а также

к иммунным факторам, обеспечивать непрерывную микробную диссеминацию в различные локусы организма, приводя к хронизации инфекционного процесса и возможным рецидивам инфекции в течение неограниченного времени.

Представители рода *Staphylococcus* являются одними из основных возбудителей перипротезной инфекции (ППИ) с широким набором факторов патогенности и персистенции. *Staphylococcus aureus* способен к внутриклеточному существованию во многих клетках костной ткани, включая остеобласты, остеокласты и остеоциты, а в случае системной инфекции — в иммунных клетках (клетки Купфера, макрофаги) [2, 3]. Наиболее проблемными и затратными для лечения являются инфекции, вызванные метициллин-резистентными *S. aureus* (MRSA). В травматолого-ортопедических отделениях нашей страны устойчивость к метициллину выявлена у 42,1% изолятов *S. aureus* [5]. Существующие в настоящее время антибактериальные препараты (линезолид, даптомицин, клиндамицин, цефтаролин, тедизолид, оритаванцин и другие) обеспечивают альтернативные методы лечения патогенов с множественной лекарственной устойчивостью, однако ванкомицин по-прежнему остается антибиотиком первого выбора в большинстве стран при MRSA-инфекции [6, 7].

Для локальной профилактики возникновения ППИ и лечения инфекционных осложнений после протезирования различных суставов применяют спейсеры на основе полиметилметакрилата (ПММА), импрегнированные антимикробными средствами [8, 9, 10]. Готовый коммерческий костный цемент содержит в своем составе тобрамицин, гентамицин и ряд других препаратов. В.А. Конев с соавторами в эксперименте *in vivo* показали, что образцы готового костного цемента, содержащего гентамицин в количестве 4,22 масс.%, утрачивали свою антимикробную активность (АМА) через 1–2 сут. и без импрегнации дополнительным антибиотиком оказались малоэффективными. В свою очередь внесение 10 масс.% фосфомицина позволило пролонгировать антимикробную активность образцов до нескольких недель в отношении *S. aureus* ATCC 6538 [11]. G. Gasparini с соавторами регистрировали элюцию меронема из костного цемента в течение 21 суток [12]. Д.В. Тапальский с соавторами установили, что композитные покрытия, имеющие в составе ципрофлоксацин, а также комбинацию серебра и ципрофлоксацина, полностью предотвращали образование биопленок *S. aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* [13]. Также выявлено, что ионы серебра характеризуются антиадгезивным действием и препятствуют образованию биопленок на поверхности спейсера из ПММА [14]. К. Kalishwaralal с соавторами продемонстрировали, что наночастицы серебра в концентрации

100 нМ почти полностью предотвращали биопленкообразование *S. epidermidis* [15]. Возможно, добавление в состав спейсера высокодисперсного серебра пролонгирует высвобождение действующего вещества в перипротезную область в течение значительного периода времени.

Цель исследования — оценить длительность антимикробной активности и влияние на формирование биопленки MRSA ATCC 43300 образцов костного цемента с генатмицином, импрегнированных ванкомицином и/или высокодисперсным серебром.

Материал и методы

Контрольные образцы готовили из коммерческого костного цемента на основе полиметилметакрилата (ПММА) DePuy CMW 1 Gentamicin (DePuy Synthes), содержащего 4,22% гентамицина (КЦ-гента), без внесения дополнительного антибиотика. Выбор костного цемента с гентамицином для приготовления контрольных образцов обусловлен высокой частотой его использования в ортопедии в сравнении с цементом без внесения антибактериальных препаратов. Для получения опытных образцов в асептических условиях 40 г сухого вещества смешивали с соответствующим количеством дополнительного ванкомицина (Эльфа Lab, Индия) и/или высокодисперсного серебра Повиаргол (Технолог, Россия). Повиаргол представляет собой порошок темно-зеленого цвета, полученный распылительной сушкой и состоящий из высокодисперсных наночастиц серебра, стабилизированных поливинилпирролидоном (ПВП). Частицы Повиаргола, полученные распылительной сушкой, имеют округлую форму и напоминают сдутый мяч. Размер частиц составляет от 2 до 16 мкм (рис. 1).

Полученную сухую смесь перемешивали с необходимым количеством мономера и формировали образцы необходимой формы. Состав тестируемых образцов представлен в таблице 1.

Для определения длительности антимикробной активности (АМА) в отношении *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) готовили стандартные бусины диаметром 9 мм и весом 0,4 г (рис. 2). Вещества для импрегнации в виде порошка сначала вручную смешивали с сухой частью костного цемента, а потом в полученную часть вносили раствор метилметакрилата и тщательно все перемешивали до получения однородной массы, из которой с помощью силиконовой формы формировали бусины. Морфологию (равномерность распределения компонентов) и элементный состав образцов костного цемента, содержащего Вд-Аg, исследовали методами сканирующей электронной микроскопии и микрорентгеноспектрального анализа на исследовательском комплексе TESCAN Vega.

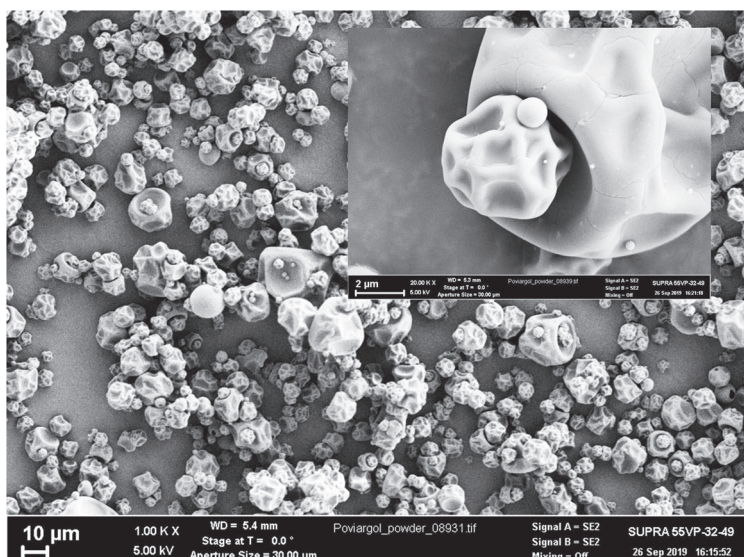


Рис. 1. Микрофотографии частиц Повиаргола (сканирующая электронная микроскопия)

Figure 1. Micrographs of Poviargolum particles (scanning electron microscopy)

Таблица 1

Состав тестируемых образцов костного цемента

Компонент	Контроль	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4
ПММА с 4,22% гентамицина	+	+	+	+	+
Ванкомицин	-	10 масс.%	-	10 масс.%	10 масс.%
Высокодисперсное серебро с ПВП (ВД-Ag)	-	-	10 масс.%	2,5 масс.%	10 масс.%



Рис. 2. Бусины, сформированные из костного цемента

Figure 2. Bone cement beads

Каждый образец (в трех повторностях) помещали в отдельную стерильную пробирку, содержащую 3 мл 0,9% NaCl, и инкубировали в течение суток при температуре 37°C. Пробирки фиксировали в шейкере (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Biosan) 50 об/мин. На следующие сутки образец переносили в новую пробирку со свежим физиологическим раствором и продолжали инкубировать в прежних условиях. Взвесь бактерий (0,5 McF) заседали на поверхность агара Мюллера-Хинтона (Oxoid, Англия). После каждых суток инкубации 10 мкл инкубационного раствора наносили в дубликатах на готовый бактериальный газон и инкубировали при 37°C 24 ч. Об антимикробной активности судили по наличию зоны подавления роста бактериальной культуры. Процедуру повторяли до потери образцом АМА.

Биопленки на поверхности костного цемента формировали путем погружения тестируемых образцов в 3 мл питательной среды (LB-бульон), содержащей 1×10^7 КОЕ/мл MRSA, контрольные — в стерильный LB-бульон. Инкубировали при температуре 37°C в течение 72 ч., после чего планктонную культуру удаляли, образцы дважды промывали фосфатным буфером (DPBS) и высушивали. Каждый образец помещали на 20 мин. в 1 мл 0,1% раствора кристаллического фиолетового. Краситель сливали, а образец двукратно промывали DPBS (рис. 3).

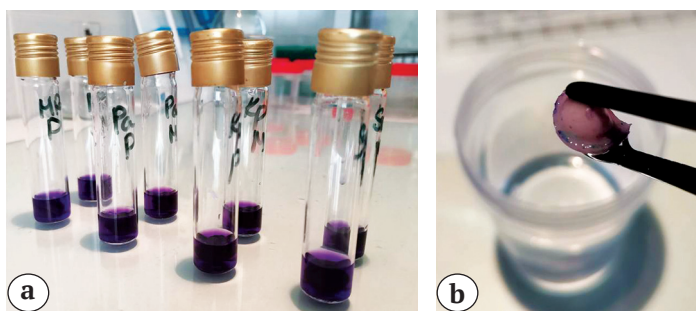


Рис. 3. Методика окраски сформированных 72-часовых биопленок MRSA на поверхности образцов костного цемента:

а – тестируемые образцы в 1 мл красителя; б – бусина костного цемента с гентамицином и ванкомицином (образец 1) после окраски и промывки

Figure 3. Method of staining formed 72-hour MRSA biofilms on the surface of bone cement samples:

a – test samples in 1 ml of dye; b – bone cement bead with gentamicin and vancomycin (sample 1) after staining and washing

Для экстракции связанного красителя бусины костного цемента помещали в 1 мл 96% этанола и выдерживали 30 мин. Биомассу сформированных пленок оценивали по оптической плотности полученных экстрактов при 570 нм на спектрофотометре SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Германия). Аналогичным способом изучали биопленкообразование MRSA на образцах костного цемента по окончании действия их антимикробной активности.

Электронные микрофотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа Carl Zeiss Supra-55 (Германия). Морфологию и элементный состав материала исследовали методами сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и микрорентгеноспектрального анализа на исследовательском комплексе TESCAN Vega.

Статистический анализ

Полученные данные анализировали с использованием программы Statistica for Windows (версия 13). Данные в таблицах представлены в виде средней величины значения оптической плотности ± ошибка среднего ($M \pm m$). Оценку нормальности распределения значений выполняли количествен-

ным методом Шапиро–Уилка (W-тест), а наличие статистической значимости различий – при помощи *t*-критерия Стьюдента. Статистически значимыми принимали значения $p < 0,05$.

Результаты

Длительность антимикробной активности опытных и контрольных образцов в отношении MRSA ATCC 43300 представлена на рисунке 4.

Контрольные образцы гентамицин-содержащего костного цемента не обладали антимикробной активностью в отношении MRSA ATCC 43300. Опытные образцы, дополнительно содержащие 10 масс.% ванкомицина, демонстрировали АМА в течение 9 сут. При внесении в КЦ-гента ВД-Аг регистрировали значительное удлинение времени АМА образцов 3 и 4: при добавлении 2,5 масс.% ВД-Аг длительность АМА составила 21 сутки, а при увеличении до 10 масс.% – 34 сут.

Энергодисперсионный анализ поверхности КЦ-гента с добавлением 10 масс.% ванкомицина и ВД-Аг в поперечном сечении показал, что в структуре скелетного типа присутствует матричный компонент на основе сульфата бария с включениями серебра (рис. 5). Также в отдельных зонах

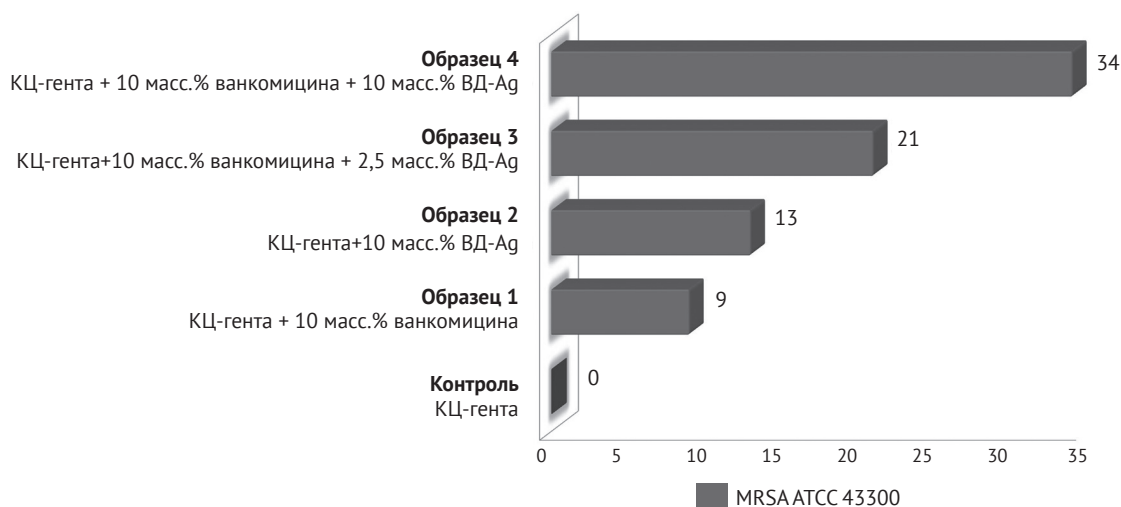
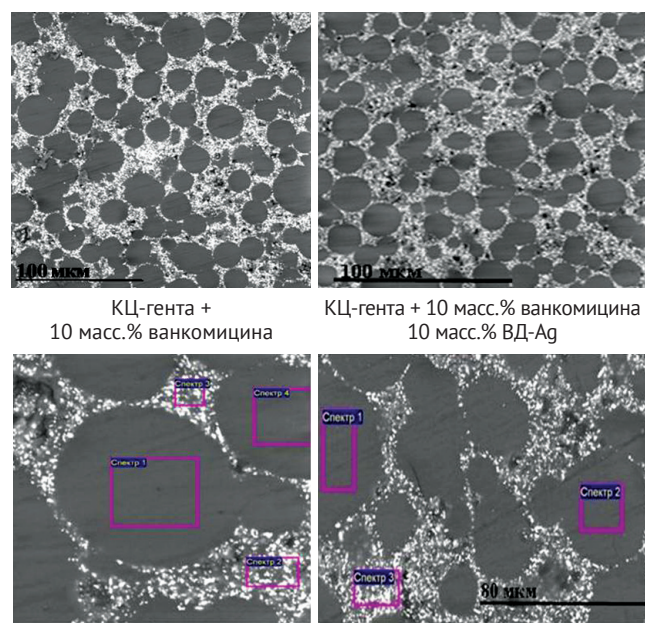


Рис. 4. Длительность антимикробной активности образцов костного цемента, сут.

Figure 4. Duration of bone cement samples antimicrobial activity, days

определено незначительное количество хлора, который может быть химически связан с серебром (табл. 2). Следует отметить равномерное распределение высокодисперсных частиц серебра в объеме исследуемого образца. В структуре материала обнаруживаются отдельные дефекты в виде пор диаметром не более 5 мкм.

В последующем изучено био пленкообразование типового штамма MRSA на поверхности образцов импрегнированного костного цемента (табл. 3).



Статистически значимых различий между оптической плотностью экстрактов генцианвиолета в стерильной питательной среде и в опыте 1 с типовым штаммом MRSA не выявлено. В соответствии с представленными данными можно говорить об эффективном противобактериальном действии костного цемента, импрегнированного антибиотиками и/или высокодисперсным серебром.

Установлена тенденция к увеличению восприимчивости образцов к красителю, что проявляется повышением оптической плотности в отрицательном контроле и в опыте 1 с увеличением массовой доли добавленных в костный цемент веществ: минимальные значения у образцов КЦ-гента, максимальные — у образцов, импрегнированных 10 масс.% ванкомицина и 10 масс.% ВД-Аг. Можно предположить, что это связано с увеличением пористости материала, что косвенно подтверждается максимальной продолжительностью антимикробной активности образцов КЦ 3 и 4, содержащих антибиотик и ВД-Аг.

Рис. 5. Микроскопическое исследование образца КЦ-гента в поперечном сечении. Общий вид структуры и спектральный анализ в отдельных участках поверхности

Figure 5. Microscopic examination of the gentamicin sample cross-section. General view of the structure and spectral analysis in individual areas of the surface

Таблица 2

Распределение элементов по спектрам

Спектр	Элементный состав, вес. %				
	O	S	Cl	Ag	Ba
КЦ-гента+10 масс.% ванкомицина					
1	80,14	4,57	–	–	15,28
2	55,64	9,72	–	–	34,64
3	51,62	11,01	–	–	37,37
4	79,72	4,45	–	–	15,83
КЦ-гента+10 масс.% ванкомицина 10 масс.% ВД-Аг					
1	77,83	4,58	–	–	17,59
2	77,06	4,90	–	–	18,04
3	57,44	7,91	1,37	4,05	29,23

Таблица 3

Биомасса 72-часовых биопленок MRSA ATCC 43300 на поверхности импрегнированного костного цемента (единицы оптической плотности)

Образец	K(-)	Опыт 1	p_1	Опыт 2	p_2
КЦ-гента	0,066±0,002	0,070±0,003	0,318	0,078±0,001	0,053
КЦ-гента + 10 масс.% ванкомицина	0,110±0,004	0,110±0,002	1,000	0,310±0,012	<0,001
КЦ-гента + 10 масс.% ВД-Ag	0,120±0,005	0,116±0,002	0,491	0,376±0,005	<0,001
КЦ-гента+10 масс.% ванкомицина + 2,5 масс.% ВД-Ag	0,137±0,017	0,118±0,007	0,349	0,280±0,016	<0,001
КЦ-гента + 10 масс.% ванкомицина + 10 масс.% ВД-Ag	0,208±0,010	0,173±0,045	0,482	0,368±0,004	0,008

K(-) — отрицательный контроль со стерильной питательной средой; Опыт 1 — опыт со свежеприготовленными образцами КЦ; Опыт 2 — опыт с образцами после прекращения их антимикробной активности; p_1 — статистическая значимость различий результатов опытов K(-) и O1; p_2 — статистическая значимость различий результатов опытов 1 и 2.

Обсуждение

Способность MRSA к адгезии и биопленкообразованию приводит к низкой эффективности лечения за счет устойчивости патогена к антибиотикам и факторам иммунной защиты организма [4]. Ключевым моментом является предупреждение формирования зрелой биопленки — иными словами, микробного очага. При первичном эндопротезировании первая линия «обороны» — это противомикробные препараты в качестве периоперационной профилактики, цель которой — предупреждение адгезии микробных клеток на устанавливаемых имплантатах. В случае выполнения санлирующей операции с установкой антимикробного спейсера пациенту с перипротезной инфекцией или остеомиелитом, помимо восполнения костного дефекта, играет роль локального депо антибиотика, которое должно обеспечивать создание эффективной концентрации антимикробного препарата до реимплантации эндопротеза. Несмотря на то, что в настоящее время есть два подхода к продолжительности периода между этапами оперативного лечения (длительный интервал — более 8 нед. и короткий — 2–4 нед.), в большинстве случаев удаление спейсера и реимплантацию эндопротеза выполняют не ранее чем через 6 нед. после радикальной хирургической обработки инфекционного очага [16]. Для полной эрадикации возбудителя в очаге инфекции очень важно, чтобы спейсер перманентно и равномерно высвобождал антибиотик в количестве, превышающем минимальные подавляющие концентрации (МПК) возбудителей до реимплантации протеза. При этом в ряде исследований показано, что малые концентрации высвобождающихся антибиотиков не препятствуют формированию микробных био-

пленок на цементном спейсере, что ведет к персистирующему характеру инфекции [17]. Известно также, что антимикробные свойства спейсера зависят от типа вносимого антибиотика, состава средств для импрегнации, способа смешивания и других характеристик самого костного цемента [18]. При добавлении доз антибиотиков, превышающих 2 г на 40 г цемента, зарегистрировано некоторое снижение прочностных свойств [11, 19, 20], что не является критичным при двухэтапном методе лечения, когда установленный антимикробный спейсер является временной конструкцией. J. Martínez-Moreno с соавторами выявили, что добавление менее 5% антибиотика не приводило к значительному ухудшению механических свойств цемента [21].

Необходимо отметить, что прочность импрегнированного костного цемента существенно зависит от его марки. Так, A.R. Bishop с соавторами установили выраженное снижение модуля сжатия при добавлении ванкомицина в Palacos®R [20]. A. Lilikakis и M.P.F. Sutcliffe показали, что все образцы цемента Palamed G и Coral, несмотря на добавление до 10% ванкомицина, превышали стандарт ISO по минимальной прочности на сжатие. При этом авторы отметили необходимость тщательного перемешивания цемента, т.к. неоднородность материала может снизить прочность на сжатие [22]. В нашем исследовании смешивание порошков ванкомицина и ВД-Ag с сухой частью костного цемента позволило достичь равномерного распределения серебра в тестируемых образцах.

Исследования длительности высвобождения антибактериальных препаратов из КЦ показали, что большая часть антибиотика вымывается в первые трое суток после имплантации, а созда-

ваемые в последующем локальные концентрации не достигают МПК [23]. Тестируемые нами образцы импрегнированного костного цемента характеризовались различной длительностью высвобождения активных противомикробных веществ и АМА, при этом контрольные образцы КЦ с гентамицином не оказали бактерицидного действия на типовой штамм MRSA. Импрегнация КЦ комбинацией ванкомицина с ВД-Аг оказывала более пролонгированный бактерицидный эффект, особенно в концентрации 4 г на 40 г сухого вещества — 34 сут. Также комбинация ВД-Аг с ванкомицином обеспечивала антибиопленочный эффект.

В своем исследовании А. Hashimoto с соавторами показали синергидный эффект наночастиц серебра и ванкомицина в отношении биопленкообразования MRSA. По мнению авторов, активность антимикробных компонентов реализуется на ранних стадиях биопленкообразования — в тот момент, когда биопленка относительно нестабильна и наименее устойчива к действию антибиотиков [24]. J. Slane с соавторами изучали антимикробные свойства костного цемента с наночастицами серебра в концентрациях до 1 масс.% и установили, что образцы не характеризовались антимикробным действием в отношении золотистых стафилококков, однако был выявлен антибиопленочный эффект у данных образцов [14].

Минимальное количество микробной биомассы получено нами на контрольных образцах, приготовленных из коммерческого цемента без дополнительной импрегнации, несмотря на отсутствие их бактерицидной активности в отношении типового штамма MRSA. При этом установленное значительное увеличение оптической плотности экстрактов красителя в опыте с потерявшими АМА опытными образцами может быть следствием не только увеличения микробной биомассы на поверхности материала, но и большего насыщения красителем пор цемента после вымывания оттуда импрегнирующих веществ, что требует дальнейших исследований. По-видимому, данные проявления обусловлены увеличением пористости опытных образцов к концу эксперимента.

Наше предположение подтверждают научные публикации об увеличении пористости костного цемента при его дополнительной импрегнации. К примеру, S. Kim с соавторами с помощью СЭМ показали, что увеличение концентрации ванкомицина с 0,25 до 2 г на 40 г цемента Simplex P увеличивает размер пор в тестируемых образцах [19]. Увеличение пористости костного цемента положительно сказывалось на длительности элюции антибиотика, в связи с чем ранее предлагали использовать декстран и глицин в качестве наполни-

телей пространства для получения более пористого материала [25, 26]. M. Nugent с соавторами также показали, что следствием добавления раствора ксилитола было увеличение пористости костного цемента и элюции антимикробных препаратов [27]. Используемый нами препарат, помимо частиц высокодисперсного металлического серебра, содержит низкомолекулярный поливинилпирролидон, который, вероятнее всего, и способствовал дополнительному порообразованию.

Ограничения исследования

Ограничением выполненного исследования можно считать недостаток данных о кинетике высвобождения ванкомицина из тестируемых образцов. Регистрацию ежесуточной элюции антибиотика выполняют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, которая позволяет количественно регистрировать динамику выхода препарата из костного цемента и определять эффективные концентрации, превышающие МИК патогенов. Ограничением является отсутствие результатов бактериологического исследования соникационной жидкости, полученной при УЗ-обработке образцов с микробной биопленкой на поверхности и подсчетом КОЕ. В дальнейшем необходимо получить данные о длительности антимикробной активности образцов с комбинацией ванкомицина и препаратом серебра в отношении различных штаммов и видов бактерий, а также изучить механические характеристики опытных образцов костного цемента.

Заключение

Применение комбинации ванкомицина с ВД-Аг обеспечило существенное пролонгирование (до 34 сут.) антимикробной активности образцов костного цемента, которая эффективно препятствовала формированию микробных биопленок на поверхности. Увеличение пористости вследствие вымывания импрегнированных веществ по окончании антимикробной активности образцов, возможно, приводит к большому риску формирования на такой поверхности микробной биопленки. Несмотря на то, что условия проведенного эксперимента *in vitro* не являются тождественными условиям клинического применения антимикробных спейсеров из костного цемента на основе ПММА, полученные нами результаты в совокупности с результатами представленных научных публикаций свидетельствуют о необходимости применять спейсеры с известной продолжительностью антимикробной активности и соблюдать сроки замены временных конструкций на постоянные эндопротезы.

Литература [References]

- Flemming H.C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S., Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(9):563-575. doi: 10.1038/nrmicro.2016.94.
- Crabbe A., Jensen P.O., Bjarnsholt T., Coenye T. Antimicrobial Tolerance and Metabolic Adaptations in Microbial Biofilms. *Trends Microbiol.* 2019;27(10):850-863. doi: 10.1016/j.tim.2019.05.003.
- Arciola C.R., Campoccia D., Montanaro L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(7):397-409. doi: 10.1038/s41579-018-0019-y.
- Lamret F., Colin M., Mongaret C., Gangloff S.C., Reffuveille F. Antibiotic Tolerance of *Staphylococcus aureus* Biofilm in Periprosthetic Joint Infections and Antibiofilm Strategies. *Antibiotics (Basel).* 2020;9(9):547. doi: 10.3390/antibiotics9090547.
- Божкова С.А., Касимова А.Р., Тихилов Р.М., Полякова Е.М., Рукина А.Н., Шабанова В.В. и др. Неблагоприятные тенденции в этиологии ортопедической инфекции: результаты 6-летнего мониторинга структуры и резистентности ведущих возбудителей. *Травматология и ортопедия России.* 2018;24(4):20-31. doi: 10.21823/2311-2905-2018-24-4-20-31. Bozhkova S.A., Kasimova A.R., Tikhilov R.M., Polyakova E.M., Rukina A.N., Shabanova V.V. et al. [Adverse Trends in the Etiology of Orthopedic Infection: Results of 6-Year Monitoring of the Structure and Resistance of Leading Pathogens]. *Travmatologiya i ortopediya Rossii* [Traumatology and Orthopedics of Russia]. 2018;24(4):20-31. (In Russian). doi: 10.21823/2311-2905-2018-24-4-20-31.
- Boswihi S.S., Udo E.E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an update on the epidemiology, treatment options and infection control. *J Curr Med Res Pract.* 2018;8(1):18-24. doi: 10.1016/j.cmrp.2018.01.001.
- Wong M., Chapman M.G., Malhotra S., Mirzanejad Y., Deans G.D. Experience with high dose once-daily vancomycin for patients with skin and soft-tissue infections in an ambulatory setting. *Open Forum Infect Dis.* 2017;4(Suppl 1):338. doi: 10.1093/ofid/ofx163.806.
- Buchholz H.W., Engelbrecht H. Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins. *Chirurg.* 1970;41(11):511-515.
- Durbhakula S.M., Czajka J., Fuchs M.D., Uhl R.L. Spacer endoprosthesis for the treatment of infected total hip arthroplasty. *J Arthroplasty.* 2004;19(6):760-767. doi: 10.1016/j.arth.2004.02.037.
- Joseph T.N., Chen A.L., Di Cesare P.E. Use of antibiotic-impregnated cement in total joint arthroplasty. *J Am Acad Orthop Surg.* 2003;11(1):38-47. doi: 10.5435/00124635-200301000-00006.
- Конев В.А., Божкова С.А., Нетылько Г.И., Афанасьев А.В., Румакин В.П., Полякова Е.М. и др. Результаты применения фосфомицина для импрегнации остеозамещающих материалов при лечении хронического остеомиелита. *Травматология и ортопедия России.* 2016;22(2):43-56. doi: 10.21823/2311-2905-2016-0-2-43-56. Konev V.A., Bozhkova S.A., Netylko G.I., Afanasiev A.V., Rumakin V.P., Polyakova E.M. et al. [Results of the fosfomycin application for the impregnation of bone replacement materials in the treatment of chronic osteomyelitis]. *Travmatologiya i ortopediya Rossii* [Traumatology and Orthopedics of Russia]. 2016;22(2):43-56. (In Russian). doi: 10.21823/2311-2905-2016-0-2-43-56.
- Gasparini G., De Gori M., Calonego G., Della Bora T., Caroleo B., Galasso O. Drug elution from high-dose antibiotic-loaded acrylic cement: a comparative, in vitro study. *Orthopedics.* 2014;37(11):e999-1005. doi: 10.3928/01477447-20141023-57.
- Тапальский Д.В., Осипов В.А., Сухая Г.Н., Ярмоленко М.А., Рогачев А.А., Рогачев А.В. биосовместимые композиционные антибактериальные покрытия для защиты имплантатов от микробных биопленок. *Проблемы здоровья и экологии.* 2013;(2):129-134. Tapalskiy D.V., Osipov V.A., Sukhaya G.N., Yarmolenko M.A., Rogachiov A.A., Rogachiov A.V. [Biocompatible composite antibacterial coatings for protection of implants against microbial biofilms]. *Problemy zdorov'a i ekologii* [Health and Ecology Issues]. 2013;(2):129-134. (In Russian).
- Slane J., Vivanco J., Rose W., Ploeg H.L., Squire M. Mechanical, material, and antimicrobial properties of acrylic bone cement impregnated with silver nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015;48:188-196. doi: 10.1016/j.msec.2014.11.068.
- Kalishwaralal K., BarathManiKanth S., Pandian S.R., Deepak V., Gurunathan S. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010;79(2):340-344. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.04.014.
- Karczewski D., Winkler T., Renz N., Trampuz A., Lieb E., Perka C. et al. A standardized interdisciplinary algorithm for the treatment of prosthetic joint infections. *Bone Joint J.* 2019;101-B(2):132-139. doi: 10.1302/0301-620X.101B2.BJJ-2018-1056.R1.
- Bertazzoni Minelli E., Della Bora T., Benini A. Different microbial biofilm formation on polymethylmethacrylate (PMMA) bone cement loaded with gentamicin and vancomycin. *Anaerobe.* 2011;17(6):380-383. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.03.013.
- Rava A., Bruzzone M., Cottino U., Enrietti E., Rossi R. Hip Spacers in Two-Stage Revision for Periprosthetic Joint Infection: A Review of Literature. *Joints.* 2019;7(2):56-63. doi: 10.1055/s-0039-1697608.
- Kim S., Bishop A.R., Squire M.W., Rose W.E., Ploeg H.L. Mechanical, elution, and antibacterial properties of simplex bone cement loaded with vancomycin. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2020;103:103588. doi: 10.1016/j.jmbbm.2019.103588.
- Bishop A.R., Kim S., Squire M.W., Rose W.E., Ploeg H.L. Vancomycin elution, activity and impact on mechanical properties when added to orthopedic bone cement. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2018;87:80-86. doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.06.033.
- Martínez-Moreno J., Merino V., Nacher A., Rodrigo J.L., Climente M., Merino-Sanjuán M. Antibiotic-loaded Bone Cement as Prophylaxis in Total Joint Replacement. *Orthop Surg.* 2017;9(4):331-341. doi: 10.1111/os.12351.
- Lilikakis A., Sutcliffe M.P.F. The effect of vancomycin addition to the compression strength of antibiotic-loaded bone cements. *Int Orthop.* 2009;33(3):815-819. doi: 10.1007/s00264-008-0521-3.
- Тапальский Д.В., Волотовский П.А., Козлова А.И., Ситник А.А. Антибактериальная активность покрытий на основе импрегнированного антибиотиками костного цемента в отношении микроорганизмов с различными уровнями антибиотикорезистентности. *Травматология и ортопедия России.* 2018;24(4):105-110. doi: 10.21823/2311-2905-2018-24-4-105-110.

- Tapalski D.V., Volotovskii P.A., Kozlova A.I., Sitnik A.A. [Antibacterial Activity of Antibiotic-Impregnated Bone Cement Based Coatings Against Microorganisms with Different Antibiotic Resistance Levels]. *Travmatologiya i ortopediya Rossii* [Traumatology and Orthopedics of Russia]. 2018;24(4):105-110. (In Russian). doi: 10.21823/2311-2905-2018-24-4-105-110.
24. Hashimoto A., Miyamoto H., Kobatake T., Nakashima T., Shobuie T., Ueno M. et al. The combination of silver-containing hydroxyapatite coating and vancomycin has a synergistic antibacterial effect on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Bone Joint Res.* 2020;9(5):211-218. doi: 10.1302/2046-3758.95.BJR-2019-0326.R1.
25. Kuechle D.K., Landon G.C., Musher D.M., Noble P.C. Elution of vancomycin, daptomycin, and amikacin from acrylic bone cement. *Clin Orthop Relat Res.* 1991;(264):302-308.
26. McLaren A.C., Nelson C.L., McLaren S.G., DeClerk G.R. The effect of glycine filler on the elution rate of gentamicin from acrylic bone cement: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;(427):25-27. doi: 10.1097/01.blo.0000143556.41472.2a.
27. Nugent M., McLaren A., Vernon B., McLemore R. Strength of antimicrobial bone cement decreases with increased poragen fraction. *Clin Orthop Relat Res.* 2010;468(8):2101-2106. doi: 10.1007/s11999-010-1264-1.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Божкова Светлана Анатольевна — д-р мед. наук, заведующая научным отделением профилактики и лечения раневой инфекции и отделением клинической фармакологии, профессор кафедры травматологии и ортопедии, ФГБУ «НМИЦ ТО им. Р.Р. Вредена» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия
e-mail: clinpharm-rniito@yandex.ru
<http://orcid.org/0000-0002-2083-2424>

Гордина Екатерина Михайловна — канд. мед. наук, старший научный сотрудник отделения профилактики и лечения раневой инфекции, ФГБУ «НМИЦ ТО им. Р.Р. Вредена» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия
e-mail: emgordina@win.rniito.ru
<http://orcid.org/0000-0003-2326-7413>

Марков Михаил Александрович — канд. техн. наук, докторант кафедры химической технологии тугоплавких неметаллических и силикатных материалов, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет)», г. Санкт-Петербург, Россия
barca0688@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3196-7535>

Афанасьев Александр Витальевич — травматолог-ортопед отделения гнойной хирургии, ФГБУ «НМИЦ ТО им. Р.Р. Вредена» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия
avafanasev@rniito.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3097-7846>

Артюх Василий Алексеевич — канд. мед. наук, заведующий отделением гнойной хирургии, ФГБУ «НМИЦ ТО им. Р.Р. Вредена» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия
artyukhva@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5087-6081>

Малафеев Константин Вадимович — аспирант лаборатории «Полимерные материалы для тканевой инженерии и трансплантологии», ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», г. Санкт-Петербург, Россия
kostya_malafeev@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8540-8608>

AUTHORS' INFORMATION:

Svetlana A. Bozhkova — Dr. Sci. (Med.), Vreden National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics, St. Petersburg, Russia
e-mail: clinpharm-rniito@yandex.ru
<http://orcid.org/0000-0002-2083-2424>

Ekaterina M. Gordina — Cand. Sci. (Med.), Vreden National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics, St. Petersburg, Russia
e-mail: emgordina@win.rniito.ru
<http://orcid.org/0000-0003-2326-7413>

Mikhail A. Markov — Cand. Sci. (Tech.), Saint-Petersburg State Institute of Technology, St. Petersburg, Russia
barca0688@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3196-7535>

Alexander V. Afanas'ev — Vreden National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics, St. Petersburg, Russia
avafanasev@rniito.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3097-7846>

Vasilii A. Artyukh — Cand. Sci. (Med.), Vreden National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics, St. Petersburg, Russia
artyukhva@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5087-6081>

Konstantin V. Malafeev — Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia
kostya_malafeev@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8540-8608>

Иванькова Елена Михайловна — канд. физ.-мат. наук, старший научный сотрудник лаборатории «Полимерные материалы для тканевой инженерии и трансплантологии», ФГБОУВО «Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра Великого»; старший научный сотрудник лаборатории механики полимеров и композиционных материалов, ФГБОУН «Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук», г. Санкт-Петербург, Россия
ivelen@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4823-0695>

Elena M. Ivan'kova — Cand. Sci. (Phys.-Math.), Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University; Institute Of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia
ivelen@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4823-0695>

Заявленный вклад авторов

Божкова С.А. — разработка концепции и дизайна исследования, интерпретация и анализ полученных данных, подготовка текста, редактирование.

Гордина Е.М. — проведение бактериологических исследований, статистическая обработка полученных данных, подготовка текста.

Марков М.А. — выполнение сканирующей электронной микроскопии и микрорентгеноспектрального анализа.

Афанасьев А.В. — подготовка образцов для исследований, проведение исследований.

Артюх В.А. — сбор и обработка материала, проведение исследований.

Малафеев К.В. — проведение исследований.

Иванькова Е.М. — выполнение сканирующей электронной микроскопии.

Все авторы прочли и одобрили финальную версию рукописи статьи. Все авторы согласны нести ответственность за все аспекты работы, чтобы обеспечить надлежащее рассмотрение и решение всех возможных вопросов, связанных с корректностью и надежностью любой части работы.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.