ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НОВОСИБИРСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ ИМ. Я.Л. ЦИВЬЯНА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИИ

(ФГБУ «ННИИТО ИМ. Я.Л. ЦИВЬЯНА» МИНЗДРАВА РОССИИ)

УДК 617.3+[616-001-089.23:615.477.2]
№ госрегистрации 115071510025
Инв. №

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБУ «ННИИТО»
им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России, д.м.н., профессор
_____ Садовой М.А.
«15» 01 2018 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Применение биополимерных биодеградируемых гидрогелевых носителей и сорбентов для нейтрализации параимплантной патогенной микробиоты на поверхности имплантируемых устройств и систем

(Заключительный)

Заместитель директора
по научной работе, д.м.н. _____ И.А. Кирилова

Руководитель темы, д.м.н. _____ В.В. Павлов
15.01.2018
(дата, подпись)

Новосибирск 2018

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы, в.н.с. ФГБУ «ННИИТО» им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России, д.м.н.	подпись, дата 15.01.2018	В.В. Павлов (весь отчет)
С.н.с. ФГБУ «ННИИТО» им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России, к.м.н.	подпись, дата 15.01.2018	А.Г. Самохин (весь отчет)
Нормоконтролер	подпись, дата 15.01.2018	А.Ф. Гусев

РЕФЕРАТ

Отчет: 24 с., 5 рисунков, 24 источника, 1 прил.

ПОЛИМЕР, НОСИТЕЛЬ, АДГЕЗИЯ, БАКТЕРИЯ, БИОДЕГРАДАЦИЯ, БАКТЕРИОФАГ, ГИДРОГЕЛЬ, *Staphylococcus aureus*.

В ходе выполнения работ был синтезирован политриметиленкарбонат с линейной и разветвленной структурой, с молекулярными массами 28 и 108 кДа соответственно, подтвержденными методом ядерно-магниторезонансной спектроскопии. Метод синтеза описан в патенте РФ №2497818 «Способ получения триметиленкарбоната». Из-за задержки выполнения работ по теме НИР в связи с необходимостью отработать способы получения гидрогеля на основе политриметиленкарбоната и способы размещения внутри него терапевтических агентов, было принято решение использовать альтернативное вещество для формирования гидрогеля с целью дальнейшей упаковки в гель бактериофагов, в качестве которого был использован альгинат натрия, который позволил осуществить успешный синтез экспериментальных образцов биодеградируемого гидрогеля на основе 3%- и 5%-ого альгината натрия.

Вышеуказанный гель при инкубации при температуре +37°С продемонстрировал возможность эмиссии бактериофага в среду с достижением роста титра бактериофага на четыре порядка от исходных величин уже на первые сутки после инкубации, тогда как концентрация бактериального тест-штамма при этом снизилась, что свидетельствовало в пользу подавления роста тест-штамма за счет массивной репликации бактериофагов, сопровождающейся лизированием бактерий. Тем самым была подтверждена возможность транспорта бактериофагов, интегрированных в биодеградируемый гидрогель, с достижением бактериофагом концентраций, обеспечивающих снижение титра тест-штамма *S. aureus* в условиях эксперимента *in vitro*.

Имеющиеся у данной экспериментальной работы ограничения, в том числе связанные с длительным отсутствием изначально планируемого гелевого носителя на основе политриметиленкарбоната, не позволили решить целый ряд запланированных задач, связанных с приданием гелю противоадгезивных, терапевтических и остеорегенерирующих свойств; не был выбран оптимальный сорбент для сопряжения с гелевым носителем и не был сформирован терапевтический комплекс на их основе, а также не проведены эксперименты по моделированию применения такого комплекса в условиях *in vivo*. Данные задачи требуют пролонгации времени, необходимого на экспериментальные работы с материалами-носителями и последующую постановку вышеназванных экспериментов в случае успеха синтеза геля на основе политриметиленкарбоната, в связи с чем исполнителями темы НИР была подана заявка о пролонгации исследования на новый период.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 7

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ 10

1 Обоснование выбора направления научного поиска 10

2 Результаты работ по созданию биодеградируемого гидрогелевого носителя для бактериофагов 14

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 20

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 22

Приложение А 24

ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящем отчете приняты следующие определения и сокращения:

атм	Атмосфера (мера давления)
КОЕ/мл	Колониеобразующая единица на 1 миллилитр
LB	Lysogeny broth (лизогенная среда)
pH	Водородный показатель

ВВЕДЕНИЕ

Повсеместное и подчас неоправданное использование антибиотиков во второй половине XX века привело к появлению полирезистентностности микроорганизмов к различным видам химических антибактериальных средств, при этом создание новых эффективных и нетоксичных антимикробных средств в фарминдустрии занимает длительное время. В этой связи существует постоянная потребность поиска альтернативных средств антимикробной терапии, а также выбора оптимальных путей их доставки и депонирования, что имеет прикладное значение при выполнении хирургических вмешательств в травматологии и ортопедии для защиты имплантируемой конструкции от возможной инфекции области хирургического вмешательства.

Используемые в настоящее время методы антибактериальной профилактики, а также хирургический метод профилактики формирования липополисахаридной биопленки, продуцируемой пленкообразующими штаммами микроорганизмов на поверхности имплантируемых медицинских изделий и систем, заключающийся в максимально полном иссечении окружающих имплантат инфицированных тканей, не всегда приводят к гарантированной санации области хирургического вмешательства, что в дальнейшем влечет за собой её реинфекцию со всеми вытекающими последствиями, и в частности – повторным формированием среды для жизнедеятельности патогенной микробиоты в области произведенного хирургического вмешательства.

Важным аспектом рассматриваемой проблемы является возможность исходного наличия патогенной микробиоты в окружающих имплантат тканях либо её присоединения гематогенным путем в дальнейшем, что ведет к колонизации имплантата микроорганизмами. Ряд возбудителей, таких как *S. aureus* и его метициллинустойчивые штаммы, способны продуцировать липополисахаридные биопленки в местах своей адгезии (Рисунок 1) на

поверхности металлов, протезов сосудов и других видов имплантатов медицинского назначения, что требует значительного увеличения рабочих концентраций антибиотиков и ухудшает возможность доставки антибактериальных терапевтических средств в воспалительный очаг за счет барьерных свойств бактериальной биопленки, защищающей бактерии от внешних воздействий.

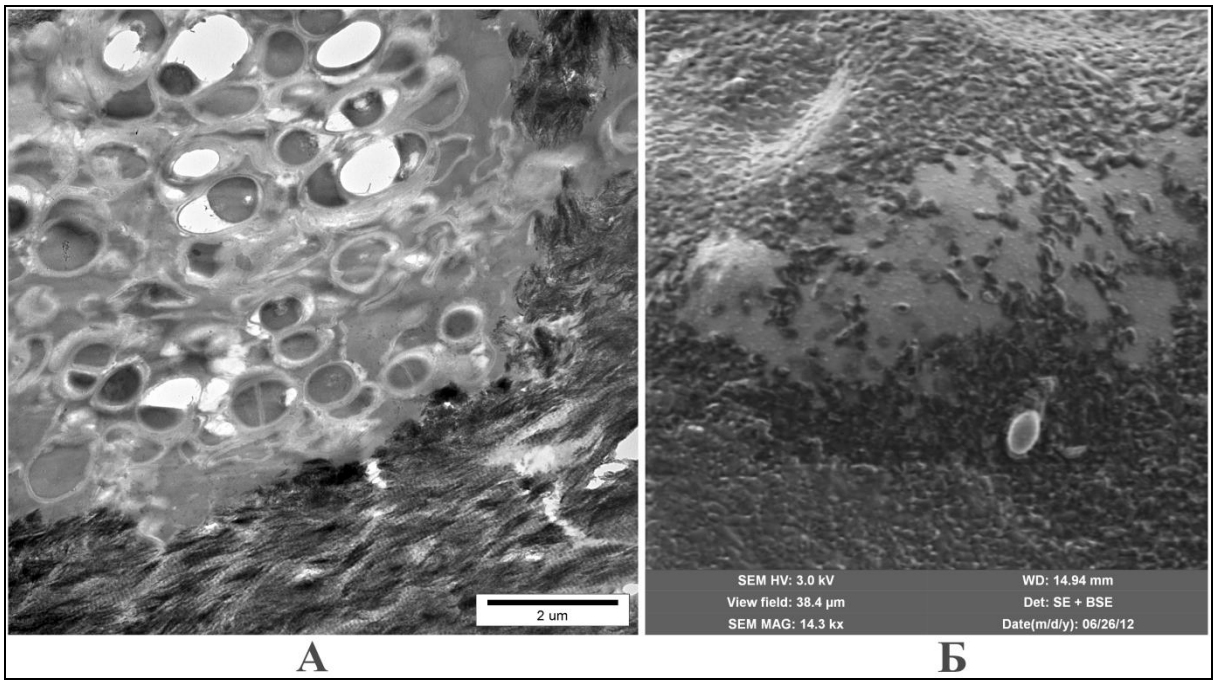

Рисунок 1 - Электронная микроскопия образцов биоматериала. А – Биопленка, образованная *S. aureus*, выделенная с поверхности ортопедического металлоимплантата. Трансмиссионная электронная микроскопия (фото сделано авторами). Б – Сплошная колонизация имплантата из чистого титана *Ps. aeruginosa*. Сканирующая электронная микроскопия (фото сделано авторами).

Одним из существующих на сегодняшний день методов борьбы с бактериальными инфекциями, лишенных таких недостатков антибиотиков, как снижение концентрации агента с течением времени и возможные аллергические реакции (Alisky J et al., 1998), являются естественные вирусы, инфицирующие бактерии – бактериофаги. В силу особенностей строения и активности бактериофаги способны преодолевать экзополимерный субстрат (ЭПС) биопленок, вызывая значительные изменения в самих биопленках (Hughes et al. 1998; Hanlon et al. 2001; Sillankorva et al. 2004; Sharma et al. 2005;

Lu and Collins 2007; Sillankorva et al., 2008). Поэтому вызывает оптимизм возможное применение литических бактериофагов для лизиса бактерий в биопленках или же разрыхление самой структуры ЭПС опять же под воздействием ферментных структур, кодируемых бактериофагами.

Однако при этом возникает необходимость создания средства доставки (носитель) бактериофагов в воспалительный очаг, которое обладало бы целым рядом качеств, таких как возможность депонирования терапевтического агента, биодеградация носителя в очаге воспаления с возможностью эмиссии транспортируемого агента в окружающую среду, регулируемая скорость биодеградации носителя для поддержания требуемых концентраций терапевтического агента с течением времени, нетоксичность самого носителя а также продуктов его деградации для макроорганизма.

С учетом вышесказанного, дальнейшие перспективы создания эффективной защиты медицинских имплантируемых устройств и изделий лежат в области поиска, разработки и применения новых терапевтических агентов, имеющих направленное воздействие на патогенные микроорганизмы, а также средств их доставки и контролируемой эмиссии в макроорганизме. В этой связи нами в настоящем исследовании была сформулирована тематика научно-исследовательской работы (НИР) по разработке метода элиминации патогенных микроорганизмов и предупреждения их адгезии к металлоимплантатам медицинского назначения на основе применения терапевтического комплекса из биополимерных биодеградируемых гидрогелевых носителей и сорбентов с заданными свойствами.

Настоящий отчет является заключительным по данной теме НИР. Промежуточные отчеты по теме НИР «Применение биополимерных биодеградируемых гидрогелевых носителей и сорбентов для нейтрализации параимплантной патогенной микробиоты на поверхности имплантируемых устройств и систем (Промежуточный)» были представлены в 2015 и 2016 годах.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

1 Обоснование выбора направления научного поиска

Проблема полирезистентных штаммов патогенных микроорганизмов в клинической практике с каждым годом приобретает всё большие масштабы, в связи с чем клиницистам по всему миру всё чаще приходится сталкиваться со штаммами бактерий, против которых или нет эффективного антибиотика или же для лечения возможен лишь один класс антибиотиков (Skurnik D. et al., 2012). Одной из причин такого распространения бактериальной резистентности является также и 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 имплантата (Рисунок 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 конструкции, которые приготовляют *ex tempore* 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. (т.н. «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 антибиотики, 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.

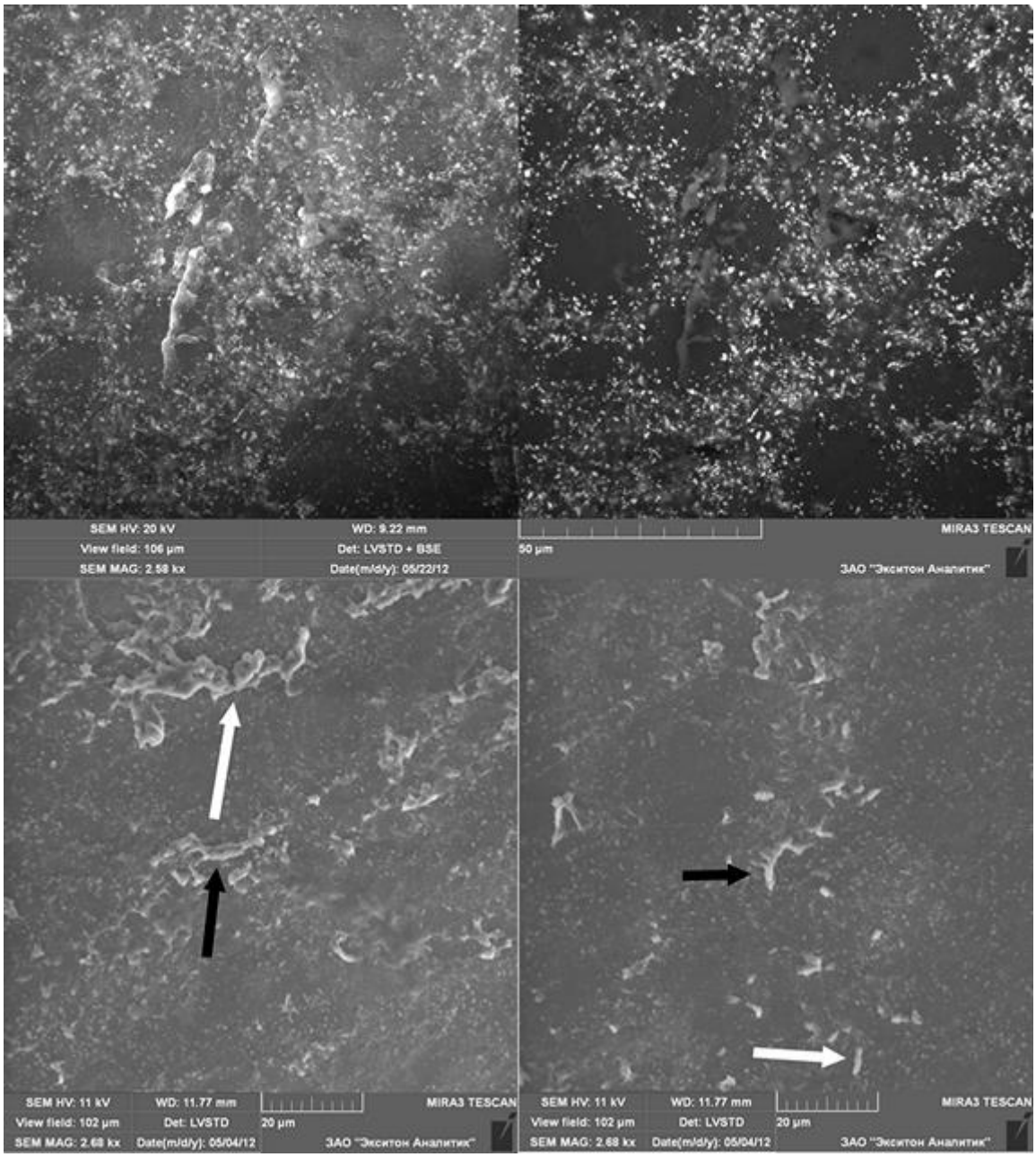

Рисунок 2 - Пример формирования биопленки на поверхности полимерного имплантата из полиметилметакрилата, эксплантированого в ходе хирургического вмешательства. Для биопленки на полимерных материалах характерно морфологическое разнообразие. На одном образце могут обнаруживаться как кокковые (белая стрелка), так и удлиненные (черная стрелка) формы бактерий, располагающиеся на поверхности в виде отдельных колоний. Сканирующая электронная микроскопия (фото сделано авторами).

Однако такой способ защиты имплантата из полиметилметакрилата

также не является совершенным, поскольку диффузия антибиотика в окружающие ткани при хорошо гомогенизированном полиметилметакрилате может не происходить вовсе из-за возможного отсутствия проницаемости полиметилметакрилата для антибиотика (Baker A, Greenham L., 1988) и чрезмерно высокой скорости эмиссии антибиотика из такого носителя, что радикально уменьшает сроки его терапевтической эффективности (Schiefer U. et al., 2008). Помимо этого, в опубликованных в мировой литературе мета-аналитических 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 (Hinarejos P., 2015; Wang J. et al., 2013) .

В этой связи возникает потребность в формировании защиты имплантируемых изделий и систем медицинского назначения против их колонизации патогенными микроорганизмами, и наиболее пригодными для построения такого рода защиты представляются носители на основе биодеградируемых полимеров, которые с течением времени деградируют, обеспечивая эмиссию терапевтического агента в окружающие ткани, и при этом не требуют повторного хирургического вмешательства для извлечения отработанного носителя. Анализ мировой литературы показывает что, несмотря на достаточно большой выбор биодеградируемых полимеров, которые можно было бы использовать для доставки антибактериальных терапевтических средств в очаг воспаления, их выбор для применения в медицинской сфере ограничивается целым рядом факторов, среди которых можно выделить такие аспекты, как скорость биодеградации, продукты биодеградации и их влияние на окружающие клетки и ткани, взаимодействие с иммунной системой макроорганизма (K. Fukushima, 2015; C.G. Ambrose, T.O. Clanton, 2004).

Среди достаточно большого многообразия биодеградируемых полимеров можно выделить несколько наиболее вероятных кандидатов для создания биодеградируемого гидрогелевого носителя – хитозан, полиэтиленгликоль, поли-D-L-лактид и сравнительно новый триметиленкарбонат. Если первые три достаточно хорошо известны, наряду с опытом их применения в медицинской практике в качестве биодеградируемых носителей и биодеградируемых изделий, в том числе гидрогелевых (А. Е. Мочалова и соавт., 2009; Ulery BD et al., 2011), то последний, триметиленкарбонат, сравнительно недавно вошел в медицинскую практику и до сих пор ещё является предметом изучения, однако его свойства выглядят достаточно многообещающими (Kluin OS et al., 2013): в отличие от синтетических полимеров, которые деградируют сразу сплошной массой, триметиленкарбонат может деградировать постепенно и послойно, что при должном подборе молекулярной массы, судя по экспериментам *in vitro*, позволяет контролировать скорость высвобождения включенного в состав такого носителя какого-либо агента, например, антибиотика, причем сама кинетика высвобождения будет иметь нулевой порядок (Kluin OS et al., 2009). Более того, возможно производство гидрогелей на основе этого полимера (Sharifi S et al., 2012), что открывает дальнейшие пути его возможного применения в практике.

Собственно сам такой полимер полностью деградирует в костной ткани и способствует регенерации кости (Van Leeuwen AC et al., 2012), при этом деградация в условиях *in vivo* происходит за счет энзимов, а сам полимер чрезвычайно гидролитически стабилен и не дает закисления среды продуктами своего распада (Kluin OS et al., 2013; Zhang Z et al., 2009; Peˆgo AP et al., 2003), чем выгодно отличается от полимеров молочной кислоты, которые могут изменять pH в кислую сторону и тем самым нарушать работу включенных в такой носитель агентов, например, бактериофагов, что требует применения разного рода стабилизаторов и иных способов уменьшения влияния продуктов деградации на агент и на условия среды, однако подобные

влияния могут быть устранены лишь частично (Pavot V et al., 2014), что налагает определенные ограничения на возможности прикладного использования.

При всем этом необходимо признать, что до настоящего момента в мировой литературе не представлены работы, посвященные применению триметиленкарбоната как средства доставки бактериофагов, что и обусловило его выбор в качестве одного из кандидатов на данную роль.

2 Результаты работ по созданию биодеградируемого гидрогелевого носителя для бактериофагов

Для выполнения экспериментальных исследований в рамках настоящей НИР на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук (ИОС УроРАН) был синтезирован политриметиленкарбонат с линейной и разветвленной структурой, с молекулярными массами 28 и 108 кДа соответственно, подтвержденными методом ядерно-магниторезонансной спектроскопии. Метод синтеза описан в патенте РФ №2497818 «Способ получения триметиленкарбоната».

Дальнейший план работ предполагал получение из синтезированного полимера опытных образцов биодеградируемого гидрогелевого носителя, однако из-за задержки выполнения работ по теме НИР в связи полуторалетним временным дефицитом, и потребностью в том, чтобы отработать способы получения геля на основе политриметиленкарбоната и способы размещения внутри него терапевтических агентов (бактериофаги), сроки выполнения данного календарного этапа работ были вначале смещены на начало 2017 года, а затем сдвинуты на неопределенный срок ввиду отсутствия стабильного варианта геля с необходимыми свойствами.

Одновременно была проведена экспериментальная работа по изучению возможности изготовления биодеградируемого мягкотканного изделия, как

альтернатива гидрогелю, которое было бы пригодным для транспортировки терапевтических агентов – с этой целью были проведены эксперименты по изготовлению полимерного тканевого полотна путем электроформования методом электроспиннинга. В качестве исходного сырья был взят политриметиленкарбонат двух разных молекулярных масс (28 и 108 кДа) с различной внутренней структурой (линейчатой и разветвленной), из которого были приготовлены растворы полимеров с различной концентрацией (от 5 до 30% с шагом в 5%) и использованы различные растворители (дихлорметан), в том числе сложные (дихлорметан и диметилформамид в различных соотношениях). Для непосредственно электроформования были опробованы различные режимы выполнения электроспиннинга (варьирование ускоряющего напряжения, высоты фильеры над коллектором, скорость подачи полимера в фильеру).

Несмотря на большой диапазон опробованных режимов получения полотна, результаты данных экспериментов не продемонстрировали возможность получения структурированного полимерного полотна с периодической структурой, необходимой для увеличения рабочей поверхности полотна для фиксации в структурированном полотне транспортируемого агента, при этом остается проблема разрушающего влияния агрессивных растворителей на добавляемые в растворы полимеров активные агенты белковой природы, в связи с чем необходим поиск вариантов решения данной задачи или путем перехода на водные растворители или путем лиофилизации активных агентов перед их помещением в раствор политриметиленкарбоната.

В рамках проработки альтернативных веществ-кандидатов для формирования гидрогеля, ввиду отсутствия в распоряжении геля на основе политриметиленкарбоната, были проведены эксперименты по формированию гидрогеля на основе альгината натрия в водном растворителе, обеспечивающем максимально щадящие условия для транспортируемых в

геле агентов, с целью дальнейшей упаковки в гель бактериофагов и последующей проверки возможности их антибактериальной активности после расшивания связей гидрогеля. В случае успеха предполагалось что данная рецептура будет использована в качестве приоритетной (до появления в распоряжении гидрогеля на основе политриметиленкарбоната) и с нею будут проведены эксперименты по проверке биодеградации с оценкой функциональной активности транспортируемых в геле агентов при естественной деградации геля-носителя.

В ходе этих работ был осуществлен успешный синтез экспериментальных образцов гидрогеля на основе 3%- и 5%-ого альгината натрия (исходное альгинатное сырье производства «Sigma-Aldrich», США) со сшивкой ионами кальция, пригодного для последующей стерилизации, для осуществления которой были проверены два способа: фильтрация компонентов гидрогеля (до добавления в гидрогель бактериофагов) через микропористый фильтр с сечением пор 0,20 мкм и автоклавирование при температуре +120°С и давлении 2,0 атм. В обоих случаях гель сохранял свои функциональные свойства и был пригоден для дальнейшего использования (однако в случае автоклавирования требуется последующее доведение объема гидрогеля до исходных величин путем приливания соответствующих объемов стерильной воды ввиду упаривания жидкой фазы из гидрогеля в ходе автоклавирования). Стерилизации подвергали все компоненты будущего гидрогеля (раствор хлористого кальция, раствор альгината натрия, а также раствор с бактериофагами), сшивание гидрогеля производили только из стерильных компонентов. Полученный гель перемещали в лизогенную среду (LB), имеющую нейтральную pH. Внешний вид экспериментальных образцов гидрогеля в жидкой фазе (Рисунок 3) и с отобранным избытком раствора сшивающего агента (хлористый кальций) (Рисунок 4), с интегрированным в него бактериофагом в терапевтическом титре (не менее чем 10^8 КОЕ/мл), представлен на фотоизображениях ниже.

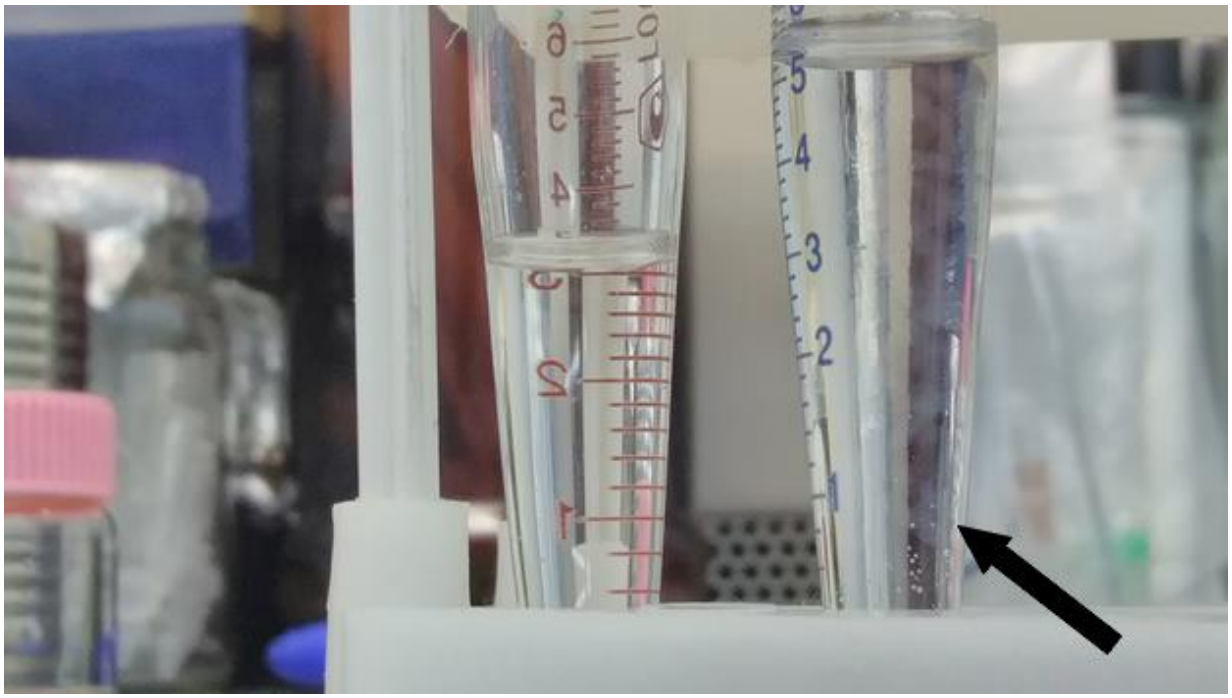

Рисунок 3 – Внешний вид гидрогеля на основе альгината натрия (пробирка справа). Непосредственно сам гидрогель на фотографии имеет вид полупрозрачных сфер (обозначены черной стрелкой).

В качестве бактериального тест-штамма при проверке литической активности интегрированных в гидрогель бактериофагов во всех экспериментах был использован метициллин-резистентный *S. aureus* ATCC 43300 (США), добавляемый в количестве 10 мкл и титре не менее чем 10^9 КОЕ/мл. В экспериментах также использовали следующие штаммы бактериофагов:

1. Бактериофаг *ph20* (штамм депонирован в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора под номером *Ph-1312*), активный в отношении *S. aureus*.
2. Коммерчески доступный стафилококковый бактериофаг производства ФГУП НПО «Микроген» (Россия), активный в отношении *S. aureus*.

Все образцы помещали в термостат при температуре +37°С, с последующим определением титров бактериофага и бактериального тест-штамма с интервалом в одни сутки между измерениями.

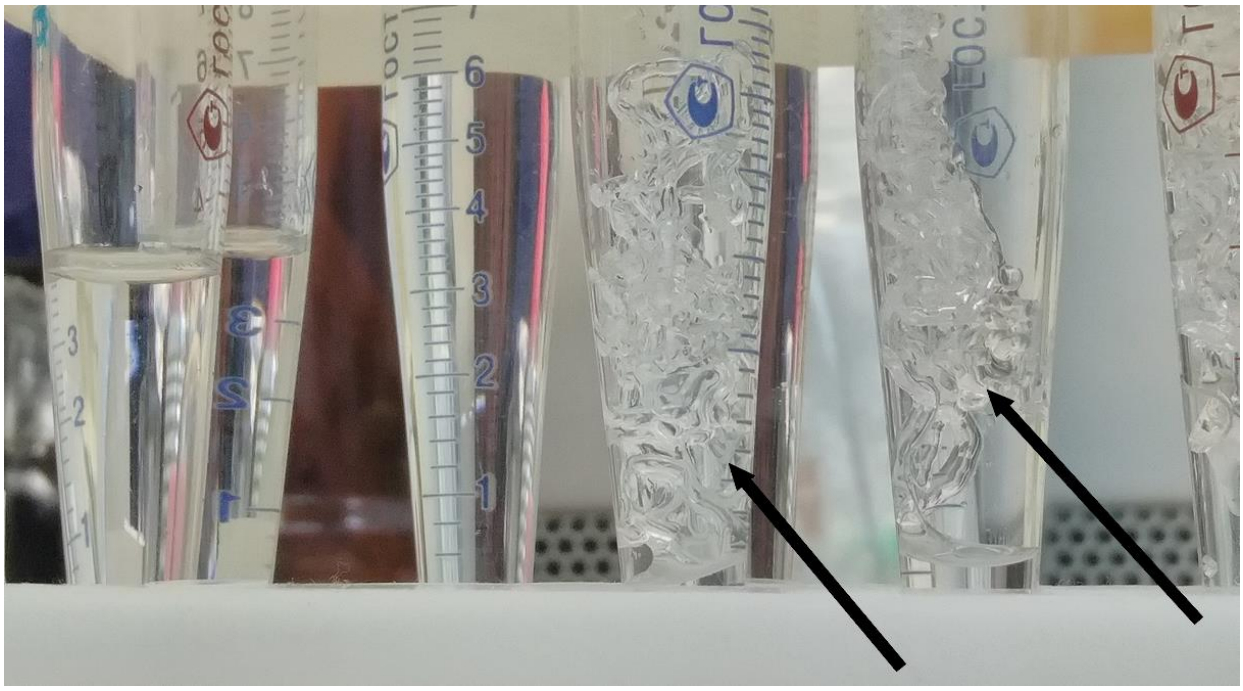

Рисунок 4 - Внешний вид гидрогеля (обозначены черной стрелкой) на основе альгината натрия с отобранным раствором сшивающего агента (хлористый кальций).

Результатом эксперимента была постепенная деградация гидрогеля, с достижением снижения концентрации культуры бактериального тест-штамма: до инкубации в термостате концентрация бактериофага равнялась $1{,}8 \times 10^5$ КОЕ/мл – спустя первые сутки после инкубации концентрация фага достигла $2{,}9 \times 10^9$ КОЕ/мл, тогда как концентрация бактериального тест-штамма снизилась с исходных $2{,}0 \times 10^6$ до $2{,}3 \times 10^5$, с последующим прогрессирующим снижением концентрации. В контрольных пробирках, инкубированных без добавления гидрогеля с содержащимся в нём бактериофагом, отмечен рост концентрации бактериального тест-штамма с исходных $2{,}0 \times 10^6$ до $1{,}5 \times 10^8$ КОЕ/мл, что визуально сопровождается отчетливым помутнением среды (Рисунок 5), тогда как в пробирках, содержавших в себе образцы гидрогеля, цвет среды сохранился прозрачным, что также свидетельствует в пользу подавления роста тест-штамма за счет массивной репликации бактериофагов, сопровождающейся лизированием бактерий.

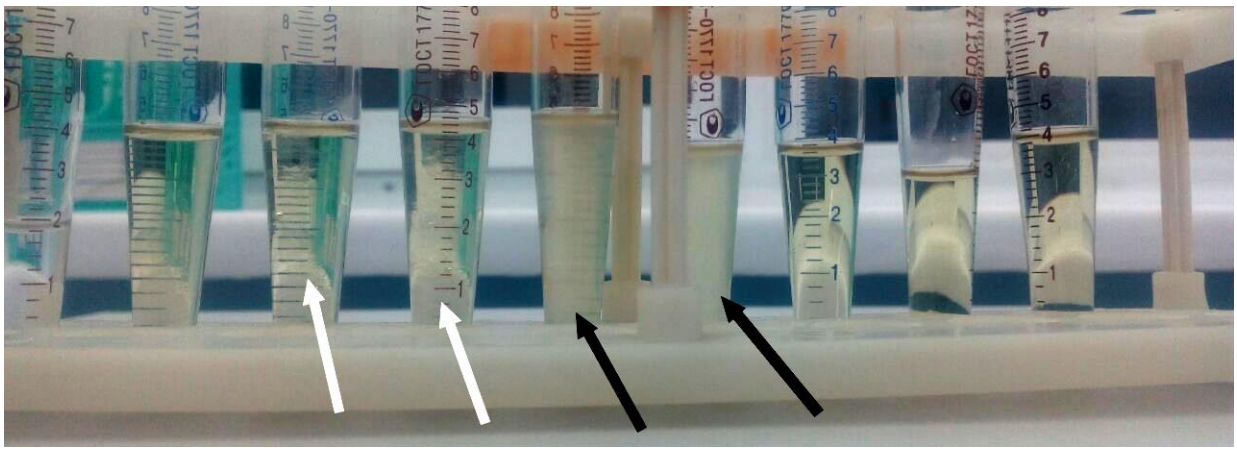

Рисунок 5 – Результат инкубации пробирок с гидрогелем и контрольных пробирок – в контрольных пробирках, содержавших только среду LB и культуру бактериального тест-штамма, произошел значительный рост концентрации бактерий, что сопровождается помутнением среды (обозначено черной стрелкой). В пробирках с гидрогелем, содержавшим бактериофаги, среда осталась прозрачной (обозначено белой стрелкой).

Вместе с тем, данный эксперимент имеет определенные ограничения, связанные с тем, что оптимальные условия деградации альгината достигаются только в кислой pH среды, тогда как среда LB обладает нейтральной pH, что требует модификации такого гидрогеля с целью интеграции в него модификаторов, способствующих индукции разложения гидрогеля на составляющие компоненты и последующего высвобождения транспортируемого агента из гидрогеля в окружающую среду.

Также, в виду длительного отсутствия изначально планируемого гелевого носителя на основе политриметиленкарбоната, запланированные задачи, связанные с приданием гелю противоадгезивных, терапевтических и остеорегенерирующих свойств, отсрочены; не выбран оптимальный сорбент для сопряжения с гелевым носителем и не сформирован терапевтический комплекс на их основе, а также не проведены эксперименты по моделированию применения такого комплекса в условиях *in vivo*.

Тем не менее, возможность транспорта бактериофагов, интегрированных в биодеградируемый гидрогель, в ходе данного эксперимента была подтверждена, с достижением бактериофагом концентраций, обеспечивающих снижение титра тест-штамма *S. aureus* в условиях эксперимента *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Был осуществлен синтез политриметиленкарбоната с линейной и разветвленной структурой, с молекулярными массами 28 и 108 кДа соответственно, подтвержденными методом ядерно-магниторезонансной спектроскопии. Дальнейший план работ предполагал получение из синтезированного полимера опытных образцов полимерного биодеградируемого гидрогелевого носителя, однако из-за задержки выполнения работ по теме НИР в связи с необходимостью отработать способы получения гидрогеля на основе политриметиленкарбоната и способы размещения внутри него терапевтических агентов (бактериофаги) сроки выполнения данного календарного этапа работ были смещены на неопределенный срок.

2. Альгинат натрия, использованный в качестве альтернативного вещества для формирования гидрогеля с целью дальнейшей упаковки в гель бактериофагов, позволил осуществить успешный синтез экспериментальных образцов биодеградируемого гидрогеля на основе 3%- и 5%-ого альгината натрия: данный гель при инкубации при температуре +37°С продемонстрировал возможность эмиссии бактериофага в среду с достижением роста титра бактериофага с исходных $1{,}8 \times 10^5$ КОЕ/мл до $2{,}9 \times 10^9$ КОЕ/мл уже на первые сутки после инкубации, тогда как концентрация бактериального тест-штамма при этом снизилась с исходных $2{,}0 \times 10^6$ до $2{,}3 \times 10^5$, с последующим прогрессирующим снижением концентрации, что свидетельствует в пользу подавления роста тест-штамма за счет массивной репликации бактериофагов, сопровождающейся лизированием бактерий. Данный результат подтвердил возможность транспорта бактериофагов, интегрированных в биодеградируемый гидрогель, с достижением бактериофагом концентраций, обеспечивающих снижение титра тест-штамма *S. aureus* в условиях эксперимента *in vitro*.

3. Имеющиеся у данной экспериментальной работы ограничения, в том

числе связанные с длительным отсутствием изначально планируемого гелевого носителя на основе политриметиленкарбоната, не позволили решить целый ряд запланированных задач, связанных с приданием гелю противоадгезивных, терапевтических и остеорегенерирующих свойств; не был выбран оптимальный сорбент для сопряжения с гелевым носителем и не был сформирован терапевтический комплекс на их основе, а также не проведены эксперименты по моделированию применения такого комплекса в условиях *in vivo*. Данные задачи требуют пролонгации времени, необходимого на экспериментальные работы с материалами-носителями и последующую постановку вышеназванных экспериментов в случае успеха синтеза геля на основе политриметиленкарбоната, в связи с чем исполнителями темы НИР была подана заявка о пролонгации исследования на новый период.

4. Информация о публикациях по теме исследования приведена в приложении А.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Пат. 2497818 РФ. Способ получения триметиленкарбоната. / Пестов А.В., Кузнецов В. А., Ятлук Ю. Г.; заявл. 04.07.2012; опубл. 10.11.2013, бюлл. № 31.

2. Alisky J, Iczkowski K, Rapoport A, Troitsky N. Bacteriophages Show Promise as Antimicrobial Agents. Journal of Infection. 1998;36:5-15.

3. Skurnik D, Davis M, Benedetti D et al. Targeting Pan-Resistant Bacteria With Antibodies to a Broadly Conserved Surface Polysaccharide Expressed During Infection. The Journal of Infectious Diseases. 2012;205(11):1709-1718. doi:10.1093/infdis/jis254.

4. Baker A, Greenham L. Release of gentamicin from acrylic bone cement. Elution and diffusion studies. The Journal of Bone & Joint Surgery. 1988;70(10):1551-1557. doi:10.2106/00004623-198870100-00015.

5. Schiefer U, Heiss C, Dingeldein E, et al. Elution kinetics and antimicrobial effects of gentamicin- and clindamycin-loaded bone cements in vitro. Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie. 2008;146(01):92-98. doi: 10.1055/s-2007-989301.

6. 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

7. Hinarejos P. Use of antibiotic-loaded cement in total knee arthroplasty. World Journal of Orthopedics. 2015;6(11):877. doi: 10.5312/wjo.v6.i11.877

8. K. Fukushima Poly(trimethylene carbonate)-based polymers engineered for biodegradable functional biomaterials. Biomater. Sci., 2015, DOI: 10.1039/C5BM00123D.

9. Bioabsorbable Implants: Review of Clinical Experience in Orthopedic Surgery C.G. Ambrose, T.O. Clanton. Annals of Biomedical Engineering, Vol. 32, No. 1, January 2004, pp. 171–177.

10. Hughes KA, Sutherland IW, Jones MV. 1998b. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. Microbiology 144:3039-3047.

11. Hanlon GW, Denyer SP, Olliff CJ, Ibrahim LJ. 2001. Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through biofilms. Appl Environ Microbiol 167:2746-2753.

12. S. Sillankorva, R. Oliveira, M. João Vieira, I. Sutherland, J. Azeredo Bacteriophage Φ S1 Infection of Pseudomonas fluorescens Planktonic Cells versus Biofilms. Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research. 2004. Volume 20, Issue 3. P. 133-138. DOI: 10.1080/08927010410001723834

13. Sharma M, Ryu J-H, Beuchat LR. 2005. Inactivation of O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and bacteriophage. J Appl Microbiol 99: 449-459.

14. Lu TK, Collins JJ. 2007. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. Proc Natl Acad Sci USA 104:11197-11202.

15. Sillankorva S, Oliveira R, Vieira MJ, Azeredo J. 2008. Real-time quantification of cell removal from glass surfaces due to bacteriophage phi S1 application. J Appl Microbiol 105:196-202.

16. Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical applications of biodegradable polymers. J Polym Sci B Polym Phys 2011;49:832-64

17. Термо- и pH-чувствительные гидрогели на основе хитозана, полученные с использованием диазида терефталевой кислоты. А. Е. Мочалова, А. В. Будруев, А. В. Олейник, Л. А. Смирнова. Перспективные материалы. 2009. - № 5.

18. Van Leeuwen AC, Van Kooten TG, Grijpma DW, Bos RRM. In vivo behaviour of a biodegradable poly (trimethylene carbonate) barrier membrane: a histological study in rats. J Mater Sci Mater Med 2012;23:1951-9.

19. Kluin OS, Van der Mei HC, Busscher HJ, Neut D. A surface-eroding antibiotic delivery system based on poly-(trimethylene carbonate). Biomaterials 2009;30:4738-42

20. Zhang Z, Kuijer R, Bulstra SK, et al. The in vivo and in vitro degradation behavior of poly(trimethylene carbonate). Biomaterials 2006;27:1741-8

21. Peˆgo AP, Van Luyn MJ, Brouwer LA, et al. In vivo behavior of poly (1,3-trimethylene carbonate) and copolymers of 1,3-trimethylene carbonate with D,L-lactide or epsilon-caprolactone: degradation and tissue response. J Biomed Mater Res A 2003;67:1044-54

22. Otto S Kluin, Henny C van der Mei, Henk J Busscher & Danie¨lle Neut. Expert opinion on drug delivery · January 2013 Impact Factor: 4.84 · DOI: 10.1517/17425247.2013.751371

23. Sharifi S, Blanquer SB, van Kooten TG, Grijpma DW. Biodegradable nanocomposite hydrogel structures with enhanced mechanical properties prepared by photo-crosslinking solutions of poly(trimethylene carbonate)-poly(ethylene glycol)-poly(trimethylene carbonate) macromonomers and nanoclay particles. Acta Biomater. 2012 Dec;8(12):4233-43. doi: 10.1016/j.actbio.2012.09.014. Epub 2012 Sep 17.

24. Pavot V, Berthet M, Rességuier J, Legaz S, Handké N, Gilbert SC, Paul S, Verrier B. Poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery. Nanomedicine (Lond). 2014 Dec;9(17):2703-18. doi: 10.2217/nnm.14.156.

Приложение А

Опубликованные статьи по теме НИР

1) Самохин А.Г. Применение бактериофагов при одноэтапном хирургическом лечении парапротезной инфекции после артропластики тазобедренного сустава (пилотное исследование) / Самохин А.Г., Фёдоров Е.А., Козлова Ю.Н., Тикунова Н.В., Павлов В.В., Морозова В.В., Кретьен С.О. // Современные проблемы науки и образования. 2016. – № 6; URL: http://www.science-education.ru/article/view?id=25851 (дата обращения: 15.12.2016).
2) Самохин А.Г., Козлова Ю.Н., Корнеев Д.В., Таранов О.С., Фёдоров Е.А., Павлов В.В., Морозова В.В., Сильников В.Н., Тикунова Н.В. Современные экспериментальные методы предотвращения бактериальной адгезии и нарушения внутреннего гомеостаза бактерий: обзор литературы // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2017. – № 11 (часть 2); URL: http://www.applied-research.ru/ru/article/view?id=12008 (дата обращения: 10.01.2018).
3) Генетическая и биохимическая характеризация стафилококков, встречающихся в Новосибирске / Козлова Ю., Фоменко Н., Морозова В., Саранина И., Тикунов А., Ганичев Д., Самохин А., Павлов В., Рожнова О., Бондарь И., Зенкова Е., Нимаев В., Климонтов В., Тикунова Н. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. №8. DOI 10.18699/VJ17.318