

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-49-57>  
УДК 615.014.2



Оригинальная статья / Research article

## Разработка и изучение антибактериальных покрытий *in situ* для обработки имплантатов

Е. О. Бахрушина<sup>1</sup>✉, А. А. Попова<sup>1</sup>, М. В. Помыткина<sup>1</sup>, М. Н. Анурова<sup>1,2</sup>,  
Н. Б. Демина<sup>1</sup>, И. И. Краснюк<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт фармации им. А. П. Нелюбина Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовского Университета), 119571, Россия, г. Москва, просп. Вернадского, д. 96, корп. 1

<sup>2</sup> Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора), 125212, Россия, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10

✉ Контактное лицо: Бахрушина Елена Олеговна. E-mail: bachrauschenh@mail.ru

ORCID: Е. О. Бахрушина – <https://orcid.org/0000-0001-8695-0346>; А. А. Попова – <https://orcid.org/0000-0002-3874-8626>; М. В. Помыткина – <https://orcid.org/0000-0002-6380-1302>;  
М. Н. Анурова – <https://orcid.org/0000-0002-7649-9616>; Н. Б. Демина – <https://orcid.org/0000-0003-4307-8791>; И. И. Краснюк – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Статья поступила: 18.07.2022

Статья принята в печать: 29.06.2023

Статья опубликована: 25.08.2023

### Резюме

**Введение.** Перипротезные инфекции являются серьезной проблемой ортопедической хирургии. Наиболее оптимальный способ воздействия на бактериальную пленку заключается в подавлении ранних стадий ее образования. Использование гидрогелевых покрытий для профилактики перипротезных инфекций является эффективной мерой, при этом процесс нанесения покрытия на имплантат можно упростить благодаря применению технологии создания *in situ* систем.

**Цель.** Целью исследования является разработка и изучение антибактериальных *in situ* покрытий для предоперационной обработки имплантатов.

**Материалы и методы.** В эксперименте использовали полоксамеры Kolliphor® P 407 и Kolliphor® P 188 (BASF, Германия), гиалуроновую кислоту высокомолекулярную PrincipHYAL® (1400–1800 кДа), низкомолекулярную PrincipHYAL® (400–600 кДа), смесь из высоко-, средне- и низкомолекулярных кислот PrincipHYAL® Cube3 (ROELMI HPC Srl, Италия). В качестве скрининговых методов для выявления оптимальной композиции использовали измерение температуры гелеобразования, изучение pH, реологические исследования, микробиологические тесты.

**Результаты и обсуждение.** В ходе эксперимента была установлена оптимальная концентрация гиалуроновой кислоты 1400–1800 кДа – 0,5 %, при которой полученный состав при температуре  $4,5 \pm 0,5$  °C представлял собой гомогенную жидкость, а при нагревании осуществлял золь-гель переход. Было выявлено, что гиалуроновая кислота не оказывает значительного влияния на температуру гелеобразования, в связи с чем добавили полоксамер 188. Было установлено влияние молекулярной массы гиалуроновой кислоты на характеристики систем *in situ*. Высокомолекулярная гиалуроновая кислота стабилизировала показатели вязкости и улучшила адгезивные свойства системы, образцы с низкомолекулярной гиалуроновой кислотой, а также смесью из высоко-, средне- и низкомолекулярных кислот продемонстрировали меньшие показатели динамической вязкости по окончании фазового золь-гель перехода. Было проведено исследование адгезии оптимального состава, содержащего 18,0 % полоксамера 407, 2 % полоксамера 188 и 0,5 % гиалуроновой кислоты (1400–1800 кДа), к титановой пластине. При воздействии лопастной мешалки (скорость вращения 20 об/мин) в течение 15 минут и при хранении в термостате ( $37,0 \pm 0,5$  °C) в течение недели анализируемый состав продемонстрировал прочность адгезии, что обуславливает возможность использования его для создания покрытия.

**Заключение.** Путем многостадийного скрининга был отобран образец для введения модельного антибактериального компонента, представляющего собой коктейль бактериофагов *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. Микробиологические исследования показали хорошую совместимость иммунобиологической субстанции со вспомогательными веществами, что обозначило перспективность проведения дальнейших доклинических исследований.

**Ключевые слова:** *in situ* гелеобразование, покрытие имплантатов, перипротезные инфекции, гиалуроновая кислота, полоксамер, бактериофаги

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Вклад авторов.** Е. О. Бахрушина, А. А. Попова придумали и разработали эксперимент. Е. О. Бахрушина, А. А. Попова, М. В. Помыткина, М. Н. Анурова проводили различные экспериментальные работы. Е. О. Бахрушина и А. А. Попова участвовали в обработке данных. М. В. Помыткина проводил теоретические расчеты. Е. О. Бахрушина и А. А. Попова участвовали в написании текста статьи. Н. Б. Демина и И. И. Краснюк участвовали в рецензировании и одобрении статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность компании InVita за предоставление образцов гиалуроновой кислоты, московскому офису компании BASF за предоставление образцов полоксамеров. Авторы благодарят сотрудников лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского, а также руководителя лаборатории Андрея Владимировича Алешкина за помощь в проведении экспериментов и интерпретации результатов.

**Для цитирования:** Бахрушина Е. О., Попова А. А., Помыткина М. В., Анурова М. Н., Демина Н. Б., Краснюк И. И. Разработка и изучение антибактериальных покрытий *in situ* для обработки имплантатов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):49–57. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-49-57>

© Бахрушина Е. О., Попова А. А., Помыткина М. В., Анурова М. Н., Демина Н. Б., Краснюк И. И., 2023

© Bakhrushina E. O., Popova A. A., Pomytkina M. V., Anurova M. N., Demina N. B., Krasnyuk I. I., 2023

## Development and Study of Antibacterial *In situ* Coatings for Processing Implants

Elena O. Bakhrushina<sup>1</sup>✉, Anna A. Popova<sup>1</sup>, Maria V. Pomytkina<sup>1</sup>, Maria N. Anurova<sup>1,2</sup>,  
Natalia B. Demina<sup>1</sup>, Ivan I. Krasnyuk<sup>1</sup>

<sup>1</sup> A. P. Nelyubin Institute of Pharmacy, I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University, 96/1, Vernadsky Avenue, Moscow, 119571, Russia)

<sup>2</sup> G. N. Gabrichesky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare (FBIS MRIEM named after G. N. Gabrichesky Rospotrebnadzor), 10, Admirala Makarova str., Moscow, 125212, Russia

✉ Corresponding author: Elena O. Bakhrushina. E-mail: bachrauschenh@mail.ru

ORCID: Elena O. Bakhrushina – <https://orcid.org/0000-0001-8695-0346>; Anna A. Popova – <https://orcid.org/0000-0002-3874-8626>; Maria V. Pomytkina – <https://orcid.org/0000-0002-6380-1302>; Maria N. Anurova – <https://orcid.org/0000-0002-7649-9616>; Natalia B. Demina – <https://orcid.org/0000-0003-4307-8791>; Ivan I. Krasnyuk – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Received: 18.07.2022

Revised: 29.06.2023

Published: 25.08.2023

### Abstract

**Introduction.** Periprosthetic infections are a major problem in orthopedic surgery. The most optimal way to influence the bacterial film is to suppress the early stages of its formation. The use of hydrogel coatings for the prevention of periprosthetic infections is an effective measure, while the process of coating the implant can be simplified due to the use of *in situ* systems.

**Aim.** The purpose of the research is to develop and study antibacterial *in situ* coatings for preoperative treatment of implants.

**Materials and methods.** In the experiment we used poloxamers Kolliphor® P 407 and Kolliphor® P 188 (BASF, Germany), hyaluronic acid high-molecular PrincipHYAL® (1400–1800 kDa), low-molecular PrincipHYAL® (400–600 kDa), mixture of high, medium and low-molecular acids PrincipHYAL® Cube3 (ROELMI HPC Srl, Italy). As screening methods for identifying the optimal composition, we used gelation temperature measurements, pH measurements, studies of rheological properties, and microbiological tests.

**Results and discussion.** During the experiment, we found the optimal concentration of hyaluronic acid 1400–1800 kDa – 0.5 %, at which the studied composition at a temperature of  $4.5 \pm 0.5$  °C was a homogeneous liquid, and it made a sol-gel transition when heated. It was revealed that hyaluronic acid had no significant effect on the gelling temperature, so we added poloxamer 188. We also established the influence of the hyaluronic acid molecular weight on the *in situ* systems characteristics. High molecular weight hyaluronic acid stabilized the viscosity values and improved the adhesive properties of the system, samples with medium and low molecular weight hyaluronic acid showed lower dynamic viscosity values at the phase gel-sol transition end. We tested the optimal composition (containing 18.0 % poloxamer 407, 2 % poloxamer 188, and 0.5 % hyaluronic acid (1400–1800 kDa) adhesion to the titanium plate. When exposed to the paddle stirrer (rotation speed 20 rpm) for 15 minutes and stored in the thermostat ( $37.0 \pm 0.5$  °C) for a week, the analyzed composition showed adhesion strength, which makes it possible to use it for coating.

**Conclusion.** By multistage screening a sample was selected for introduction of a model antibacterial component representing a cocktail of bacteriophages *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. Microbiological studies showed good compatibility of the immunobiological substance with excipients, which indicated the prospects for further preclinical studies.

**Keywords:** *in situ* gelling, implant coating, periprosthetic infections, hyaluronic acid, poloxamer, bacteriophages

**Conflict of interest.** The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Contribution of the authors.** Elena O. Bakhrushina, Anna A. Popova designed and developed an experiment. Elena O. Bakhrushina, Anna A. Popova, Maria V. Pomytkina, Maria N. Anurova carried out various experiments. Elena O. Bakhrushina and Anna A. Popova participated in data processing. Maria V. Pomytkina carried out theoretical calculations. Elena O. Bakhrushina and Anna A. Popova participated in writing the text of the article. Natalia B. Demina and Ivan I. Krasnyuk participated in the review and approval of the article. All authors participated in the discussion of the results.

**Acknowledgment.** The authors express their gratitude to InVita for providing hyaluronic acid samples, and to the Moscow office of BASF for providing poloxamer samples. The authors thank the staff of the Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages of the Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after G. N. Gabrichesky, as well as the head of the laboratory, Andrey V. Aleshkin for their help in conducting experiments and interpreting the results.

**For citation:** Bakhrushina E.O., Popova A.A., Pomytkina M.V., Anurova M.N., Demina N.B., Krasnyuk I.I. Development and study of antibacterial *in situ* coatings for processing implants. *Drug development & registration*. 2023;12(3):49–57. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-49-57>

## ВВЕДЕНИЕ

Перипротезные инфекции являются одной из наиболее серьезных проблем современной ортопедической хирургии. Они могут возникать периоперационно в результате прямой микробной контаминации во время операции или постоперационно путем гематогенного распространения микроорганизмов из отдаленного источника хронической инфекции. Удаление

инфицированных имплантатов с последующим иссечением поврежденных тканей и костей и длительной антимикробной терапией в настоящее время является единственной возможностью излечить эти инфекции [1]. К 2050 году прогнозируется рост числа первичных артропластических операций и еще более быстрое увеличение количества повторных вмешательств, что создаст значительную нагрузку для системы здравоохранения [2].

В последние годы использование ортопедических устройств значительно возросло, что привело к увеличению случаев возникновения перипротезных инфекций [1].

Имплантаты представляют собой идеальные поверхности для бактериальной адгезии, поскольку они обычно изготовлены из кобальт-хрома, титана, керамики и полиэтилена. Тем не менее существуют стратегии преобразования протезов посредством обработки или покрытия антимикробными веществами, которые позволяют избежать формирования бактериальной пленки.

В настоящее время с этой целью используется гидрогель Defensive Antibacterial Coating (DAC®) (Novagenit, Италия), разработанный для предотвращения адгезии бактерий к протезному суставу и высвобождающий антибактериальные вещества. Гидрогель состоит из двух биodeградируемых поликислот: природного (гиалуроновой) и синтетического (полимолочной) происхождения. DAC® выпускается в форме стерильного порошка для приготовления гидрогеля путем разведения его водой для инъекций или раствором антибактериального активного фармацевтического ингредиента (АФИ). Производителем предлагается наносить полученный перед применением гидрогель на имплантат с помощью специальных инструментов.

Исследуются различные способы предотвращения адгезии бактерий к костным и суставным протезам с использованием покрытия антибиотиками. Однако за последнее десятилетие скорость развития устойчивости к антибиотикам растет угрожающими темпами. Наблюдается значительное снижение разработки новых антибактериальных препаратов фармацевтическими компаниями для преодоления резистентности бактерий. Эта тенденция привела к изучению альтернативных антимикробных стратегий [3].

Проводится множество исследований использования антисептических веществ, а также бактериофагов. Фаготерапия вновь стала потенциальной альтернативой антибиотикам для лечения сложных инфекций, включая инфекции костей и суставов. Фаги демонстрируют активность *in vitro* в отношении клинически значимых бактерий, включая устойчивые к антибиотикам штаммы [4]. Применение фагов может быть особенно эффективно в условиях, когда терапия антибиотиками нерезультативна [5]. Действительно, воздействовать на предварительно сформированную или зрелую бактериальную пленку сложно, и наиболее оптимальный способ борьбы с инфекциями заключается в подавлении ранних стадий ее образования [6].

В исследовании [7] в гидрогель DAC® добавили бактериофаги, обладающие выраженной активностью в отношении бактериальных пленок. Были отмечены синергетические эффекты при сочетании бактериофагов с антибиотиками, используемыми в самых низких концентрациях.

Таким образом, использование гидрогелевых покрытий для профилактики перипротезных инфекций является эффективной мерой, при этом процесс нанесения покрытия на имплантат можно упростить благодаря применению технологии создания *in situ* систем.

Гелеобразующие системы доставки лекарств *in situ* привлекли огромное внимание за последнее десятилетие. Перед введением они находятся в жидком состоянии и способны образовывать гели в ответ на различные эндогенные стимулы, такие как повышение температуры, изменение pH и присутствие ионов [8]. Такие системы можно вводить различными путями для обеспечения таргетной или системной доставки АФИ [9,10]. *In situ* гели для обработки поверхности имплантатов имеют значительные преимущества перед имеющимися на фармацевтическом рынке гидрогелями: их нанесение и равномерное распределение не требует длительных манипуляций, и его возможно осуществлять как путем погружения имплантата в золь перед установкой, так и при помощи напыления жидкости с использованием спрея. Застывание системы в таком случае потенцируется термостимулом при имплантировании, что приводит к тому, что гидрогелевое покрытие равномерно распределяется по поверхности протеза и способствует пролонгированному высвобождению АФИ для профилактики и лечения перипротезных инфекций.

**Цель работы:** разработать оптимальное *in situ* покрытие для имплантатов на основе полосамера 407 и гиалуроновой кислоты, изучить влияние гиалуроновой кислоты на терморевверсивные, реологические и адгезивные характеристики системы в долгосрочной перспективе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для создания терморевверсивных композиций в эксперименте использовали следующие материалы: полосамер 407 Kolliphor® P 407, полосамер 188 Kolliphor® P 188 (BASF, Германия), гиалуроновую кислоту высокомолекулярную PrincipHYAL® (1400–1800 кДа), низкомолекулярную гиалуроновую кислоту PrincipHYAL® (400–600 кДа), смесь из трех гиалуроновых кислот высоко-, средне- и низкой молекулярных масс PrincipHYAL® Cube3 (ROELMI HPC Srl, Италия).

Образцы на основе полосамеров получали «холодным» методом. Диспергирование и смешивание компонентов проводилось в течение 30 минут на магнитной мешалке C-MAG HS 7 digital (IKA, Германия). Далее образцы отправляли на хранение в фармацевтический холодильник (АО «ПОЗиС», Россия) при температуре  $4,5 \pm 0,5$  °C на 1 сутки (таблица 1).

Температуру гелеобразования у образцов, представляющих собой прозрачные текучие жидкости при извлечении из холодильника, измеряли при нагревании на водяной бане ODA-LQ40 (ODA, Россия) при постоянной температуре  $50 \pm 1$  °C, используя погружной измерительный термозонд (PT 100.30, IKA, Германия), еженедельно на протяжении 12 месяцев. Перед

Таблица 1. Экспериментальные составы поликомпонентных *in situ* композиций

Table 1. Experimental compositions of polycomponent *in situ* composition

| Вспомогательные вещества, %<br>Excipients, %                                                                           | 1                    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Полоксамер 407<br>Poloxamer 407                                                                                        | 18,0                 | 18,0 | 18,0 | 18,0 | 18,0 | 18,0 | 18,0 | 18,0 |
| Полоксамер 188<br>Poloxamer 188                                                                                        | –                    | 1,0  | 1,5  | 2,0  | 2,5  | 3,0  | 2,0  | 2,0  |
| Гиалуроновая кислота высокомолекулярная<br>(1400–1800 кДа)<br>Hyaluronic acid high molecular weight<br>(1400–1800 kDa) | 0,5                  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | –    | –    |
| Гиалуроновая кислота низкомолекулярная<br>(400–600 кДа)<br>Hyaluronic acid low molecular weight<br>(400–600 kDa)       | –                    | –    | –    | –    | –    | –    | 0,5  | –    |
| Гиалуроновая кислота Cube3<br>Hyaluronic acid Cube3                                                                    | –                    | –    | –    | –    | –    | –    | –    | 0,5  |
| Вода очищенная<br>Purified water                                                                                       | до 100,0<br>ad 100,0 |      |      |      |      |      |      |      |

измерением образцы отстаивались в течение 30 минут при температуре  $20 \pm 1$  °C. За показатель температуры и времени гелеобразования принимали значения, определяемые при увеличении динамической вязкости образца в процессе его перемешивания.

Для обработки полученных экспериментальных данных были использованы статистические методы расчета среднего значения температуры гелеобразования и среднеквадратичного отклонения выборки  $\sigma$ .

Для образцов с оптимальными показателями температуры гелеобразования изучали реологические характеристики, иллюстрирующие изменения структурно-механического поведения при температурном реверсе. Исследование проводили на коаксильном ротационном вискозиметре RM 220 (LAMY RHEOLOGY, Франция) в режиме вращения измерительной геометрии «цилиндр в цилиндре» при постоянной скорости  $100 \text{ с}^{-1}$  в диапазоне температур от  $15,0$  до  $45,0 \pm 0,3$  °C. Последовательные пятикратные измерения для одной и той же навески образца, включая в дизайн эксперимента получасовую релаксацию образца при температуре  $23 \pm 1$  °C после снятия сдвигового напряжения, способствовали получению статистически достоверных значений. С помощью pH-метра модели Starter 2100 (OHAUS Corporation, США) измеряли pH оптимальных по анализируемым характеристикам экспериментальных образцов.

На следующем этапе скрининга отбирали образцы с наилучшими показателями стабильности, температуры гелеобразования и реологическими характеристиками для проведения исследования адгезии к титановому покрытию ортопедических пластин. Титановую пластину погружали в полимерную емкость с составом, далее нагревали до температуры гелеобразования. После этого пластину с полученным покрытием помещали в 200 мл фосфатного буферного раствора (pH 6,8), нагретого до температуры  $37,0 \pm 0,5$  °C. В ходе эксперимента устанавли-

валась прочность удержания *in situ* покрытия на пластине в течение 15 минут при воздействии лопастной верхнеприводной мешалки EUROSTAR 40 digital (IKA, Германия) со скоростью 100 об/мин. Также визуально исследовали продолжительность адгезии покрытия при хранении титановой пластины с нанесенным составом в среде фосфатного буфера в термостате BD 115 (Binder GmbH, Германия) в течение 1 недели при температуре  $37,0 \pm 0,5$  °C.

Заключительный этап разработки состоял в изучении совместимости оптимальной композиции с модельным коктейлем бактериофагов, полученным в ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского, и изучении как влияния активной иммунобиологической субстанции на термоселективные свойства системы доставки, так и влияния состава на литическую активность коктейля бактериофагов по методу Грация [11].

Метод Грация основан на внесении различных разведений титруемого бактериофага в соответствующую культуру бактерий и посева на плотную питательную среду с целью получения негативных (на которых отсутствует рост бактериальной культуры или происходит ее лизис в результате попадания частиц бактериофагов) колоний бактериофага. На фоне равномерного роста микроорганизмов отмечаются пятна, где рост отсутствует (полный лизис). При большом количестве бактериофагов наступает лизис микроорганизмов на всей поверхности питательной среды. Когда количество фаговых частиц невелико, то участков лизиса мало и возможно рассчитать количество бляшкообразующих единиц (БОЕ) фага в 1 мл препарата, допуская, что каждый участок лизиса образовывался в результате действия одной частицы фага [11].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования экспериментально было установлено содержание высокомолекулярной гиалуроновой кислоты (ВГК) в составах, необхо-

димое для придания оптимальных характеристик *in situ* системам. В целях сокращения экспериментальных составов, а также времени проведения исследований было предложено считать высшую оптимальную концентрацию ВГК предельной для других видов гиалуроновых кислот, использующихся в работе.

Основными критериями скрининга были: агрегатное состояние образцов и среднее значение показателя температуры гелеобразования. При концентрациях гиалуроновой кислоты 0,75 % и 1 % составы при температуре  $4,5 \pm 0,5$  °C представляли собой плотные, студенистые, гелеобразные массы, в связи с чем они не соответствовали требованиям, предъявляемым к *in situ* системам. Оптимальная концентрация гиалуроновой кислоты, при которой составы являются гомогенными прозрачными жидкостями, составила 0,5 %. Температура золь-гель перехода этих образцов была незначительно выше ( $27,94 \pm 0,87$  °C и  $29,23 \pm 1,43$  °C соответственно), чем у чистого полоксамера 407 ( $>27$  °C).

С целью увеличения температуры гелеобразования до значений, приближенных к физиологическим условиям, в которых предполагается применение разрабатываемых покрытий имплантатов, в качестве эксципиента в составы было решено добавить полоксамер 188 [12–15]. Благодаря своей молекулярной массе (средняя молекулярная масса 8400 кДа), меньшей, чем у полоксамера 407 (средняя молекулярная масса 12600 кДа), и большему содержанию полиэтиленоксидных звеньев (80 %) он способствовал повышению температуры фазового перехода *in situ* системы ( $>30$  °C) [12, 13]. Процесс увеличения температуры гелеобразования поликомпонентных составов при добавлении полоксамера 188 обуславливается тем, что критическая концентрация мицеллообразования для полоксамера 188 достигается при более высокой температуре [14, 15].

В таблице 2 приведены результаты измерений температуры гелеобразования бинарных и тройных композиций в процессе долгосрочного хранения – на протяжении 12 месяцев.

**Таблица 2. Результаты испытаний экспериментальных составов в процессе долгосрочного хранения**

**Table 2. Experimental compositions test results during long-term storage**

| Состав<br>Composition | Средняя температура гелеобразования, °C (n = 12)<br>Average gelation temperature, °C (n = 12) | Среднеквадратическое отклонение, σ<br>Standard deviation, σ |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 1                     | 27,94                                                                                         | 1,54                                                        |
| 2                     | 29,23                                                                                         | 2,53                                                        |
| 3                     | 32,53                                                                                         | 3,62                                                        |
| 4                     | 38,00                                                                                         | 2,98                                                        |
| 5                     | 39,63                                                                                         | 3,29                                                        |
| 6                     | 41,31                                                                                         | 2,48                                                        |
| 7                     | 37,89                                                                                         | 1,54                                                        |
| 8                     | 41,11                                                                                         | 2,52                                                        |

На основании полученных данных было показано, что гиалуроновая кислота и полоксамер 188 не оказывают достоверного влияния на стабильность показателя температуры гелеобразования [15, 16].

Для изучения реологических характеристик были отобраны образцы 4, 7, 8, представляющие собой трехкомпонентные композиции полоксамеров с гиалуроновой кислотой, обладающие оптимальными значениями температуры гелеобразования (37–40 °C), а также, что немаловажно, большей стабильностью этого показателя, определенного путем расчета среднеквадратичного отклонения результатов при измерении в течение 12 месяцев. Образцы 3 и 5 характеризовались крайней нестабильностью температуры гелеобразования в долгосрочных исследованиях, в то время как образец 6 имел чрезмерно высокую температуру, которая была стабильна относительно прочих результатов в пуле составов ( $\sigma = 2,48$ ). Значения pH выбранных образцов приведены в таблице 3. Все полученные композиции имели нейтральный pH, что делает возможным их использование в дальнейшей разработке и потенциальное введение иммунологической субстанции.

**Таблица 3. Значения pH экспериментальных образцов (n = 10)**

**Table 3. pH measures of experimental samples (n = 10)**

| Состав<br>Composition | Значение pH<br>pH measures |
|-----------------------|----------------------------|
| 4                     | $7,12 \pm 0,2$             |
| 7                     | $7,36 \pm 0,2$             |
| 8                     | $7,02 \pm 0,2$             |

Выбранные образцы были проанализированы с использованием реологических методов для оценки влияния молекулярной массы гиалуроновой кислоты на структурно-механические показатели. На рисунке 1 представлены реограммы выбранных составов 4, 7, 8. Измерения проводились через 24 часа после изготовления и структурирования композиций. По данным приведенных ниже реограмм видно, что форма профилей анализируемых образцов была сопоставима.

При температуре  $31,7 \pm 0,2$  °C у состава 4 наблюдается резкое изменение вязкости, что свидетельствует о начале фазового перехода. Затем происходит линейное увеличение вязкости и выход на плато при значении температуры  $37,3 \pm 0,2$  °C с максимальным значением динамической вязкости в среднем  $1,9645 \pm 0,0340$  Па · с.

Для состава 7 вязкость начинает линейно возрастать при значении температуры  $33,5 \pm 0,1$  °C и выходит на плато при значении  $38,7 \pm 0,1$  °C, максимальное значение динамической вязкости в среднем составляет  $1,7899 \pm 0,0087$  Па · с. На реограмме состава 8 начало фазового перехода отмечается при  $34,3 \pm 0,2$  °C с выходом на плато при температуре  $39,8 \pm 0,2$  °C и достижением максимального значения ди-

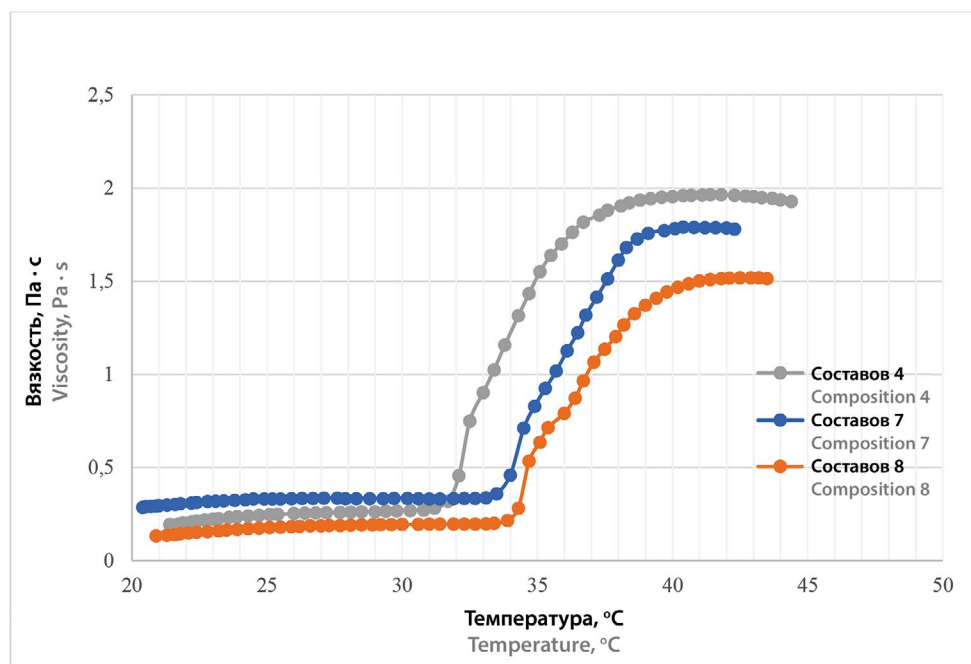


Рисунок 1. Усредненные реограммы составов 4, 7 и 8, измеренные в диапазоне температур ( $n = 5$ )

Figure 1. Averaged rheograms of compositions 4, 7, and 8 measured over a range of temperatures ( $n = 5$ )

намической вязкости, равного в среднем  $1,5195 \pm 0,0248$  Па·с.

По результатам реологического исследования можно отметить, что наибольший показатель динамической вязкости (в среднем  $1,9645 \pm 0,0083$  Па·с) был зафиксирован у образца 8 с высокомолекулярной гиалуроновой кислотой в составе. Образцы 4 и 7 с низкомолекулярной гиалуроновой кислотой и смесью из трех гиалуроновых кислот различной молекулярной массы продемонстрировали меньшие показатели вязкости. Также выход на плато у этих составов происходил при более высокой температуре ( $38,7^\circ\text{C}$  и  $39,8^\circ\text{C}$ ) [17]

Современные ротационные вискозиметры также находят применение в качестве доступного аналитического оборудования для изучения характера и качественной оценки показателя адгезии полимерной композиции [18]. Известны исследования, описывающие применение ротационной вискозиметрии для изучения мукоадгезии – для смесей полимеров и раствора муцина [18–20]. В настоящем исследовании выбранный на основе ряда тестов образец анализировали по характеру изменения величины напряжения сдвига при раскручивании коаксиальной геометрии от 0 до  $5\text{ с}^{-1}$ . Этот тест призван проиллюстрировать возможности адгезии состава к материалу внутреннего цилиндра (нержавеющая сталь).

При реологическом исследовании адгезивных свойств состава 4 (рисунок 2) были получены следующие данные: напряжение сдвига при вращении измерительной геометрии на низких скоростях варьируется от 60 до 80 Па, изменяется в узком диапазоне без

выраженных пиков, что свидетельствует о высокой степени адгезии состава к поверхности.

По результатам комплекса вышеописанных исследований был выбран состав 4, обладающий оптимальным значением показателя температуры гелеобразования, а также реологическими свойствами, для проведения эксперимента по изучению адгезивной способности к титановому покрытию пластины, использующейся в ортопедической практике.

При погружении пластины, предварительно обработанной составом 4 в качестве *in situ* покрытия, в буферный раствор pH 6,8, термостатируемый при температуре  $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , под воздействием лопастной мешалки (скорость вращения 20 об/мин) в течение 15 минут исследуемое покрытие плотно удерживалось на титановой поверхности (рисунок 3).

При дальнейшем хранении пластины с нанесенным составом в термостате при температуре  $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  в течение 1 недели наблюдалась целостность исследуемого покрытия, отслаивающегося от титановой поверхности спустя 8 дней.

Далее в определенный в ходе проведенных экспериментов как оптимальный состав 4 после автоклавирования вводили иммунобиологическую субстанцию, представляющую собой коктейль бактериофагов *Klebsiella pneumoniae* KPV 9024 в титре  $5 \cdot 10^8$  БОЕ/мл, *Staphylococcus aureus* CH1 в титре  $7 \cdot 10^7$  БОЕ/мл и *Escherichia coli* V18 в титре  $5 \cdot 10^9$  БОЕ/мл в количестве 2 мл. Было отмечено, что введение модельного коктейля бактериофагов не влияет на структурно-механические показатели, а также условия протекания термореверса. Титр фагов сохранялся в течение 6 месяцев.

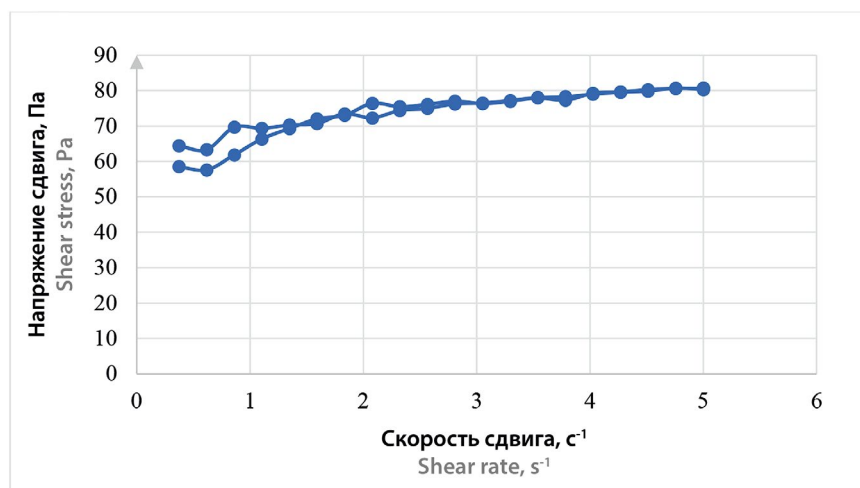


Рисунок 2. Усредненная кривая течения состава 4 ( $n = 5$ )

Figure 2. Averaged fluidity curve of composition 4 ( $n = 5$ )

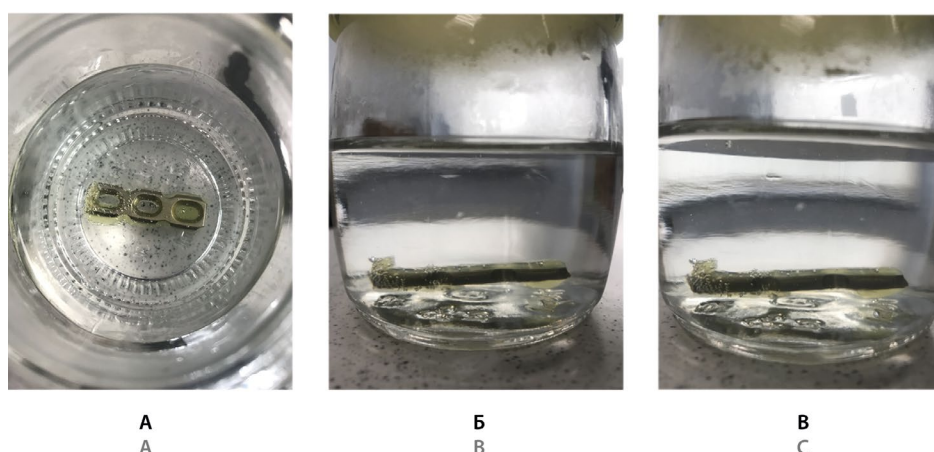


Рисунок 3. Внешний вид титановой пластины с нанесенным покрытием состава полуксамер 407 18,0 %, полуксамер 188 2,0 %, гиалуриновая кислота в/м 0,5 %:

А – титановая пластина с нанесенным покрытием в начале эксперимента (вид сверху); Б – состояние *in situ* покрытия на титановой пластине после 5 минут эксперимента (вид сбоку); В – состояние *in situ* покрытия на титановой пластине после 15 минут эксперимента (вид сбоку).

Figure 3. The appearance of a coated titanium plate with poloxamer 407 18.0 %, poloxamer 188 2.0 %, hyaluronic acid h/m 0.5 %:

A – coated titanium plate at the beginning of the experiment (top view); B – coated titanium plate with *in situ* composition after 5 min experiment (side view); C – coated titanium plate with *in situ* composition after 15 min experiment (side view).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных комплексов экспериментальных работ были предложены состав и технология получения термочувствительного антибактериального покрытия *in situ* для предотвращения перипротезного инфицирования. Путем многостадийного скрининга был отобран образец состава полуксамер 407 18,0 %, полуксамер 188 2,0 %, гиалуриновая кислота в/м 0,5 % для введения модельного антибактериального компонента, представляющего собой коктейль бактериофагов *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus*

*aureus*, *Escherichia coli*. Микробиологические исследования показали хорошую совместимость иммунобиологической субстанции со вспомогательными веществами, что обозначило перспективность проведения дальнейших доклинических исследований.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kuchariková S., Gerits E., De Brucker K., Braem A., Ceh K., Majdič G., Španič T., Pogorevc E., Verstraeten N., Tournu H., Delattin N., Impellizzeri F., Erdtmann M., Krona A., Lövenklev M., Knezevic M., Fröhlich M., Vleugels J., Fauvart M., de Silva W. J., Vandamme K., Garcia-Forgas J., Cammue B. P. A., Michiels J., Van Dijck P., Thevis-

- sen K. Covalent immobilization of antimicrobial agents on titanium prevents *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* colonization and biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;71(4):936–945. DOI: 10.1093/jac/dkv437.
2. Klug A., Gramlich Y., Rudert M., Drees P., Hoffmann R., Weißberger M., Kutzner K.P. The projected volume of primary and revision total knee arthroplasty will place an immense burden on future health care systems over the next 30 years. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2021;29(10):3287–3298. DOI: 10.1007/s00167-020-06154-7.
  3. Филь А. С., Тараканов В. Н., Куляба Т. А., Корнилов Н. Н. Тренды в первичной артропластике коленного сустава в Национальном медицинском исследовательском центре травматологии и ортопедии им. Р. Р. Вредена и их сравнительный анализ с данными международных национальных регистров: схож ли наш путь? *Геный Ортопедии.* 2022;26(4):476–483. DOI: 10.18019/1028-4427-2020-26-4-476-483.
  4. Бахрушина Е. О., Анурова М. Н., Алешкин А. В., Демина Н. Б., Краснюк И. И., Пятигорская Н. В., Береговых В. В. Некоторые аспекты применения и создания лекарственных препаратов бактериофагов. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2021;76(4):351–360. DOI: 10.15690/vramn1380.
  5. Cano E. J., Cafilisch K. M., Bollyky P. L., Van Belleghem J. D., Patel R., Fackler J., Brownstein M. J., Horne B., Biswas B., Henry M., Malagon F., Lewallen D. G., Suh G. A. Phage Therapy for Limb-threatening Prosthetic Knee *Klebsiella pneumoniae* Infection: Case Report and In Vitro Characterization of Anti-biofilm Activity. *Clin Infect Dis.* 2021;73(1):144–151. DOI: 10.1093/cid/ciaa705.
  6. Lamret F., Colin M., Mongaret C., Gangloff S. C., Refeuille F. Antibiotic Tolerance of *Staphylococcus aureus* Biofilm in Periprosthetic Joint Infections and Antibiofilm Strategies. *Antibiotics.* 2020;9(9):547. DOI: 10.3390/antibiotics9090547.
  7. Ferry T., Batailler C., Petitjean C., Chateau J., Fevre C., Forestier E., Brosset S., Leboucher G., Kolenda C., Laurent F., Lustig S. The Potential Innovative Use of Bacteriophages Within the DAC® Hydrogel to Treat Patients With Knee Megaprosthesis Infection Requiring «Debridement Antibiotics and Implant Retention» and Soft Tissue Coverage as Salvage Therapy. *Frontiers in Medicine.* 2020;7:342. DOI: 10.3389/fmed.2020.00342.
  8. Бахрушина Е. О., Демина Н. Б., Шумкова М. М., Родюк П. С., Шуликина Д. С., Краснюк И. И. Интраназальные системы доставки in situ: перспективы применения и основные фармацевтические аспекты разработки (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(4):54–63. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-54-63.
  9. Ijaz U., Sohail M., Usman Minhas M., Khan S., Hussain Z., Kazi M., Ahmed Shah S., Mahmood A., Maniruzzaman M. Biofunctional Hyaluronic Acid/κ-Carrageenan Injectable Hydrogels for Improved Drug Delivery and Wound Healing. *Polymers.* 2022;14(3):376. DOI: 10.3390/polym14030376.
  10. Viganì B., Rossi S., Sandri G., Bonferoni M. C., Caramella C. M., Ferrari F. Recent Advances in the Development of In Situ Gelling Drug Delivery Systems for Non-Parenteral Administration Routes. *Pharmaceutics.* 2020;12(9):859. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090859.
  11. Бахрушина Е. О., Анурова М. Н., Бочкарева С. С., Воробьев А. М., Щербина Ю. О., Пасивкина М. А., Крехтунова Л. О., Демина Н. Б., Алешкин А. В. Разработка и изучение ушных капель с бактериофагами для лечения инфекционных отитов, осложненных *P. aeruginosa*. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(2):74–78. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-74-78.
  12. Ruan X., Hu J., Lu L., Wang Y., Tang C., Liu F., Gao X., Zhang L., Wu H., Huang X., Wei Q. Poloxamer 407/188 Binary Thermosensitive Gel as a Moxidectin Delivery System: In Vitro Release and In Vivo Evaluation. *Molecules.* 2022;27(10):3063. DOI: 10.3390/molecules27103063.
  13. Russo E., Villa C. Poloxamer Hydrogels for Biomedical Applications. *Pharmaceutics.* 2019;11(12):671. DOI: 10.3390/pharmaceutics11120671.
  14. Mariano K. C. F., Papini J. Z. B., de Faria N. C., Heluany D. N. C., Botega A. L. L., Cereda C. M. S., de Paula E., Tófoli G. R., de Araujo D. R. Ropivacaine-Loaded Poloxamer Binary Hydrogels for Prolonged Regional Anesthesia: Structural Aspects, Biocompatibility, and Pharmacological Evaluation. *BioMed Research International.* 2021;2021:7300098. DOI: 10.1155/2021/7300098.
  15. Cui N., Dai C. Y., Mao X., Lv X., Gu Y., Lee E. S., Jiang H. B., Sun Y. Poloxamer-Based Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Gels.* 2022;8(6):360. DOI: 10.3390/gels8060360.
  16. Alexandridis P., Holzwarth J. F., Hatton T. A. Micellization of Poly(Ethylene Oxide)-Poly(Propylene Oxide)-Poly(Ethylene Oxide) Triblock Copolymers in Aqueous-Solutions-Thermodynamics of Copolymer Association. *Macromolecules.* 1994;27:2414–2425. DOI: 10.1021/MA00087A009.
  17. Del Castillo-Santaella T., Yang Y., Martínez-González I., Gálvez-Ruiz M. J., Cabrerizo-Vilchez M. Á., Holgado-Terriza J. A., Selles-Galiana F., Maldonado-Valderrama J. Effect of Hyaluronic Acid and Pluronic-F68 on the Surface Properties of Foam as a Delivery System for Polidocanol in Sclerotherapy. *Pharmaceutics.* 2020;12(11):1039. DOI: 10.3390/pharmaceutics12111039.
  18. Barbosa de Souza A., Vinícius Chaud M., Francine Alves T., Ferreira de Souza J., Andrade Santana M. H. Hyaluronic Acid in the Intestinal Tract: Influence of Structure, Rheology, and Mucoadhesion on the Intestinal Uptake in Rats. *Biomolecules.* 2020;10(10):1422. DOI: 10.3390/biom10101422.
  19. Bassi da Silva J., de Souza Ferreira S. B., Reis A. V., Cook M. T., Bruschi M. L. Assessing Mucoadhesion in Polymer Gels: The Effect of Method Type and Instrument Variables. *Polymers.* 2018;10(3):254. DOI: 10.3390/polym10030254.
  20. Mackie A. R., Goycoolea F. M., Menchicchi B., Caramella C. M., Saporito F., Lee S., Stephansen K., Chronakis I. S., Hiorth M., Adamczak M., Waldner M., Nielsen H. M., Marcelloni L. Innovative Methods and Applications in Mucoadhesion Research. *Macromolecular Bioscience.* 2017;17(8):1600534. DOI: 10.1002/mabi.201600534.

## REFERENCES

1. Kuchariková S., Gerits E., De Brucker K., Braem A., Ceh K., Majdič G., Španič T., Pogorevc E., Verstraeten N., Tournu H., Delattin N., Impellizzeri F., Erdtmann M., Krona A., Lövenklev M., Knezevic M., Fröhlich M., Vleugels J., Fauvart M., de Silva W. J., Vandamme K., Garcia-Forgas J., Cammue B. P. A., Michiels J., Van Dijck P., Thevisen K. Covalent immobilization of antimicrobial agents on titanium prevents *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* colonization and biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2016;71(4):936–945. DOI: 10.1093/jac/dkv437.
2. Klug A., Gramlich Y., Rudert M., Drees P., Hoffmann R., Weißberger M., Kutzner K.P. The projected volume of primary and revision total knee arthroplasty will place an immense burden on future health care systems over the next 30 years. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2021;29(10):3287–3298. DOI: 10.1007/s00167-020-06154-7.
3. Fil A. S., Tarakanov V. N., Kulyaba T. A., Kornilov N. N. Primary knee joint arthroplasty trends at the Vreden National Medical Research Centre for Traumatology and Orthopedics compared with other national joint replacement registries. Is our way similar? *Orthopaedic Genius.* 2020;26(4):476–483. (In Russ.) DOI: 10.18019/1028-4427-2020-26-4-476-483.
4. Bakhrušina E. O., Anurova M. N., Aleškin A. V., Demina N. B., Krasnyuk I. I., Pyatigorskaya N. V., Beregovykh V. V. Modern tendencies of the use and development of drugs of bacteriophages. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2021;76(4):351–360. (In Russ.) DOI: 10.15690/vramn1380.
5. Cano E. J., Cafilisch K. M., Bollyky P. L., Van Belleghem J. D., Patel R., Fackler J., Brownstein M. J., Horne B., Biswas B., Henry M., Malagon F., Lewallen D. G., Suh G. A. Phage Therapy for Limb-threatening Prosthetic Knee *Klebsiella pneumoniae* Infection: Case Report and In Vitro Characterization of Anti-biofilm Activity. *Clin Infect Dis.* 2021;73(1):144–151. DOI: 10.1093/cid/ciaa705.
6. Lamret F., Colin M., Mongaret C., Gangloff S. C., Refeuille F. Antibiotic Tolerance of *Staphylococcus aureus* Biofilm in Periprosthetic Joint Infections and Antibiofilm Strategies. *Antibiotics.* 2020;9(9):547. DOI: 10.3390/antibiotics9090547.

7. Ferry T., Batailler C., Petitjean C., Chateau J., Fevre C., Forestier E., Brosset S., Leboucher G., Kolenda C., Laurent F., Lustig S. The Potential Innovative Use of Bacteriophages Within the DAC® Hydrogel to Treat Patients With Knee Megaprosthesis Infection Requiring «Debridement Antibiotics and Implant Retention» and Soft Tissue Coverage as Salvage Therapy. *Frontiers in Medicine*. 2020;7:342. DOI: 10.3389/fmed.2020.00342.
8. Bakhrushina E. O., Demina N. B., Shumkova M. M., Rodyuk P. S., Shulikina D. S., Krasnyuk I. I. In situ Intranasal Delivery Systems: Application Prospects and Main Pharmaceutical Aspects of Development (Review). *Drug development & registration*. 2021;10(4): 54–63. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-54-63.
9. Ijaz U., Sohail M., Usman Minhas M., Khan S., Hussain Z., Kazi M., Ahmed Shah S., Mahmood A., Maniruzzaman M. Biofunctional Hyaluronic Acid/κ-Carrageenan Injectable Hydrogels for Improved Drug Delivery and Wound Healing. *Polymers*. 2022;14(3):376. DOI: 10.3390/polym14030376.
10. Vigani B., Rossi S., Sandri G., Bonferoni M. C., Caramella C. M., Ferrari F. Recent Advances in the Development of In Situ Gelling Drug Delivery Systems for Non-Parenteral Administration Routes. *Pharmaceutics*. 2020;12(9):859. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090859.
11. Bakhrushina E. O., Anurova M. N., Bochkareva S. S., Vorobev A. M., Shcherbina Yu. O., Pasivkina M. A., Krekhtunova L. O., Demina N. B., Aleshkin A. V. Development and Study of Bacteriophage-containing Dosage Form for the Treatment of the Outer Ear Infections. *Drug development & registration*. 2022;11(2):74–78. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-74-78.
12. Ruan X., Hu J., Lu L., Wang Y., Tang C., Liu F., Gao X., Zhang L., Wu H., Huang X., Wei Q. Poloxamer 407/188 Binary Thermosensitive Gel as a Moxidectin Delivery System: In Vitro Release and In Vivo Evaluation. *Molecules*. 2022;27(10):3063. DOI: 10.3390/molecules27103063.
13. Russo E., Villa C. Poloxamer Hydrogels for Biomedical Applications. *Pharmaceutics*. 2019;11(12):671. DOI: 10.3390/pharmaceutics11120671.
14. Mariano K. C. F., Papini J. Z. B., de Faria N. C., Heluany D. N. C., Bottega A. L. L., Cereda C. M. S., de Paula E., Tófoli G. R., de Araujo D. R. Ropivacaine-Loaded Poloxamer Binary Hydrogels for Prolonged Regional Anesthesia: Structural Aspects, Biocompatibility, and Pharmacological Evaluation. *BioMed Research International*. 2021;2021:7300098. DOI: 10.1155/2021/7300098.
15. Cui N., Dai C. Y., Mao X., Lv X., Gu Y., Lee E. S., Jiang H. B., Sun Y. Poloxamer-Based Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Gels*. 2022;8(6):360. DOI: 10.3390/gels8060360.
16. Alexandridis P., Holzwarth J. F., Hatton T. A. Micellization of Poly(Ethylene Oxide)-Poly(Propylene Oxide)-Poly(Ethylene Oxide) Triblock Copolymers in Aqueous-Solutions-Thermodynamics of Copolymer Association. *Macromolecules*. 1994;27:2414–2425. DOI: 10.1021/MA00087A009.
17. Del Castillo-Santaella T., Yang Y., Martínez-González I., Gálvez-Ruiz M. J., Cabrerizo-Vilchez M. Á., Holgado-Terriza J. A., Selles-Galiana F., Maldonado-Valderrama J. Effect of Hyaluronic Acid and Pluronic-F68 on the Surface Properties of Foam as a Delivery System for Polidocanol in Sclerotherapy. *Pharmaceutics*. 2020;12(11):1039. DOI: 10.3390/pharmaceutics12111039.
18. Barbosa de Souza A., Vinícius Chaud M., Francine Alves T., Ferreira de Souza J., Andrade Santana M. H. Hyaluronic Acid in the Intestinal Tract: Influence of Structure, Rheology, and Mucoadhesion on the Intestinal Uptake in Rats. *Biomolecules*. 2020;10(10):1422. DOI: 10.3390/biom10101422.
19. Bassi da Silva J., de Souza Ferreira S. B., Reis A. V., Cook M. T., Bruschi M. L. Assessing Mucoadhesion in Polymer Gels: The Effect of Method Type and Instrument Variables. *Polymers*. 2018;10(3):254. DOI: 10.3390/polym10030254.
20. Mackie A. R., Goycoolea F. M., Menchicchi B., Caramella C. M., Saporito F., Lee S., Stephansen K., Chronakis I. S., Hiorth M., Adamczak M., Waldner M., Nielsen H. M., Marcelloni L. Innovative Methods and Applications in Mucoadhesion Research. *Macromolecular Bioscience*. 2017;17(8):1600534. DOI: 10.1002/mabi.201600534.