

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОТИВОСПАЕЧНОГО БАРЬЕРА НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА В КОМБИНАЦИИ С БИОЦИДАМИ В УСЛОВИЯХ АБДОМИНАЛЬНОЙ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ

DOI: 10.17691/stm2018.10.2.07

УДК 615.281.9–089

Поступила 11.09.2017 г.



**М.В. Кузнецова**, д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии<sup>1</sup>;  
профессор кафедры микробиологии и вирусологии<sup>2</sup>;  
**М.П. Кузнецова**, клинический ординатор кафедры общей хирургии №1<sup>2</sup>;  
**Е.В. Афанасьевская**, к.м.н., доцент кафедры микробиологии и вирусологии<sup>2</sup>;  
**В.А. Самарцев**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей хирургии №1<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Пермь, 614081, ул. Голева, 13;

<sup>2</sup>Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера, Пермь, 614990,  
ул. Петропавловская, 26

**Цель исследования** — оценить адгезивные свойства хирургического противоспаечного барьера на основе коллагена в комбинации с 0,05% водным раствором Хлоргексидина биглюконата и Пронтосаном в эксперименте *in vitro*.

**Материалы и методы.** В работе использовали хирургический барьер КолГАРА, состоящий из ренатурированного лошадиного коллагена I типа, и референтные штаммы: *Escherichia coli* — ATCC®25922, *Klebsiella pneumoniae* — ATCC®700603, *Pseudomonas aeruginosa* — ATCC®27853, *Staphylococcus aureus* — ATCC®25923. Адгезию бактерий на барьере (мембране) без обработки и в комбинации с биоцидами оценивали методом прямого высева по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ/см<sup>2</sup>) и с помощью атомно-силовой микроскопии через 24 ч и 6 сут.

**Результаты.** Представители всех таксонов в течение суток прикреплялись к поверхности мембраны, формируя биопленку из плотно прилегающих друг к другу палочек (*E. coli*, *P. aeruginosa*) или кокков (*S. aureus*), интегрированных между дезорганизованными коллагеновыми волокнами, либо были видны отдельно адгезированные бактерии (*K. pneumoniae*). Показатель *Sq*, характеризующий шероховатость поверхности биопленки, образованной бактериями *S. aureus*, составил 221,3±38,6 нм и был выше в 3,0; 3,8 и 3,6 раза по сравнению с таковым для *E. coli* (72,8±12,6 нм), *K. pneumoniae* (57,5±21,8 нм) и *P. aeruginosa* (60,8±22,1 нм) соответственно, а также превышал в 4,4 раза данный показатель для мембраны в контроле (50,3±26,3 нм). Выявлена деградация коллагена в случае контаминации бактериями — продуцентами протеаз с коллагеназной активностью: *P. aeruginosa* на 24 ч и *S. aureus* на 6 сут. Адсорбция биоцида на поверхности мембраны после ее кратковременной экспозиции в растворе Хлоргексидина биглюконата или Пронтосана приводила к ингибированию роста и прикрепления клеток типовых штаммов бактерий, за исключением *P. aeruginosa*. В экспериментальных моделях и на агаризованной среде, и в суспензионной культуре Хлоргексидина биглюконат оказался более эффективным, чем Пронтосан. Разница в ингибировании биоцидами адгезии бактерий к мембране не связана с изменением шероховатости ее поверхности.

**Заключение.** Пропитывание хирургической мембраны антибактериальными соединениями непосредственно перед началом имплантации может служить дополнительным методом профилактики абдоминальной хирургической инфекции.

**Ключевые слова:** коллагеновая противоспаечная мембрана; адгезия бактерий; Хлоргексидина биглюконат; Пронтосан; абдоминальная хирургическая инфекция.

**Как цитировать:** Kuznetsova M.V., Kuznetsova M.P., Afanasyevskaya E.V., Samartsev V.A. Experimental grounds for using collagen-based anti-adhesion barrier coated with biocides for prevention of abdominal surgical infection. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2018; 10(2): 66–75, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.2.07>

**Для контактов:** Кузнецова Марина Валентиновна, e-mail: [mar@iegm.ru](mailto:mar@iegm.ru)

## Experimental Grounds for Using Collagen-Based Anti-Adhesion Barrier Coated with Biocides for Prevention of Abdominal Surgical Infection

**M.V. Kuznetsova**, MD, DSc, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology<sup>1</sup>;

Professor, Department of Microbiology and Virology<sup>2</sup>;

**M.P. Kuznetsova**, Resident Medical Practitioner, Department of General Surgery No.1<sup>2</sup>;

**E.V. Afanasyevskaya**, MD, PhD, Associate Professor, Department of Microbiology and Virology<sup>2</sup>;

**V.A. Samartsev**, MD, DSc, Professor, Head of Department of General Surgery No.1<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 13 Goleva St., Perm, 614081, Russia;

<sup>2</sup>E.A. Vagner Perm State Medical University, 26 Petropavlovskaya St., Perm, 614990, Russia

**The aim of the study** was to evaluate adhesive properties of the surgical anti-adhesion barrier based on collagen in combination with 0.05% Chlorhexidine bigluconate solution and Prontosan in experiment performed *in vitro*.

**Materials and Methods.** The study was carried out using CollaGUARD adhesion barrier consisting of renatured horse type I collagen and reference strains of *Escherichia coli* ATCC®25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC®700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923. Bacteria adhesion to the barrier (membrane) untreated and combined with biocides was evaluated by determining the viable colony forming unit (CFU/cm<sup>2</sup>) numbers and using atomic force microscopy after 24 h and 6 days.

**Results.** Cells of all bacterial strains adhered to the surface of the membrane within 24 h forming a biofilm of bacilli tightly adjacent to each other (*E. coli*, *P. aeruginosa*) or cocci (*S. aureus*) integrated between disorganized collagen fibers, or adherent bacteria were seen separately (*K. pneumoniae*). The *Sq* index characterizing the surface roughness of the biofilm formed by *S. aureus* bacteria was 221.3±38.6 nm and was 3.0, 3.8, and 3.6 times higher compared with that for *E. coli* (72.8±12.6 nm), *K. pneumoniae* (57.5±21.8 nm), and *P. aeruginosa* (60.8±22.1 nm), respectively, and also exceeded 4.4 times the *Sq* index for the membrane itself (50.3±26.3 nm). Collagen degradation was revealed in case of contamination by protease-producing bacteria with collagenase activity: *P. aeruginosa* for 24 h and *S. aureus* for 6 days. Adsorption of the biocide on the membrane surface after its short exposure to Chlorhexidine bigluconate solution or Prontosan led to inhibited growth and adhesion of cells of bacteria, except for *P. aeruginosa*. In experimental models, in agar medium and in suspension culture, Chlorhexidine bigluconate proved to be more effective than Prontosan. The difference between the biocides in inhibiting the adhesion of bacteria to the membrane surface is not associated with changes in its surface roughness.

**Conclusion.** Impregnation of a surgical membrane with antibacterial compounds just before the implantation can serve as an additional method for preventing abdominal surgical infection.

**Key words:** collagen anti-adhesion membrane; bacterial adhesion; Chlorhexidine bigluconate; Prontosan; abdominal surgical infection.

### Введение

В послеоперационном периоде частота развития спаечного процесса в абдоминальной хирургии продолжает оставаться высокой и может достигать 85% [1, 2]. Это сопровождается снижением качества жизни пациентов в связи с хроническим болевым синдромом и диспептическими явлениями. Кроме того, возможно развитие острой спаечной кишечной непроходимости, на долю которой приходится до 90% всех случаев острой кишечной непроходимости [3]. Оперативное лечение этой патологии связано с высоким риском травматизации тканей и летальностью [4].

Комплекс мероприятий по профилактике спаечного процесса включает минимизацию доступов, в том числе путем применения эндоскопических технологий, бережное обращение с тканями во время оперативного вмешательства, тщательный гемостаз и санацию брюшной полости нейтральными растворами, предотвращение попадания инородных тел, использование

современных ареактивных атравматических шовных материалов, а также ограничение или разобщение серозных поверхностей посредством противоспаечных барьеров (мембран) [1, 3, 5]. Механизм действия последних основан на временном разделении соприкасающихся органов на висцеральных и париетальных участках брюшной полости в течение процесса физиологической регенерации ткани. Считается, что этот метод обладает наиболее высоким профилактическим эффектом [2, 5, 6].

Противоспаечные барьеры созданы на основе различных веществ (растворы декстранов, гиалуроновая кислота, карбоксиметилцеллюлоза, коллаген) и имеют жидкое, гелеобразное или твердое агрегатное состояние. Большое внимание в качестве основы противоспаечных барьеров уделяется коллагену, достоинствами которого являются слабые антигенные свойства, нетоксичность, высокая биосовместимость, способность к биодеградации и гемостатические свойства [7, 8]. Еще одной причиной широкого применения

коллагена является прочность и стабильность волокон при образовании поперечных связей под действием глутаральдегида [9]. Показано, что использование коллагена одновременно с аллостерическими имплантатами более физиологично и повышает переносимость синтетических протезных материалов [10, 11].

Учитывая, что коллагеновая матрица может играть роль резервуара для лекарственных препаратов, пропитывание мембраны раствором антибактериального вещества непосредственно перед имплантацией может препятствовать ее взаимодействию с бактериями компрометированного биотопа. Применение биополимера с выраженной колонизационной резистентностью позволит осуществлять профилактику инфекции области хирургического вмешательства. Однако возможности применения коллагеновой мембраны у пациентов, оперированных по поводу острых хирургических заболеваний органов брюшной полости с высоким риском развития послеоперационного перитонита, остаются малоизученными.

**Цель исследования** — оценить адгезивные свойства хирургического противоспаечного барьера на основе коллагена в комбинации с биоцидами в эксперименте *in vitro*.

## Материалы и методы

В работе использовали референтные штаммы *Escherichia coli* — ATCC®25922, *Klebsiella pneumoniae* — ATCC®700603, *Pseudomonas aeruginosa* — ATCC®27853, *Staphylococcus aureus* — ATCC®25923, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов Государственного института стандартизации и контроля им. Л.А. Тарасевича (сейчас — Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, Москва).

Исследование проведено с использованием хирургического противоспаечного барьера КолГАРА (Innocoll, Германия) толщиной 0,5 мм, состоящего из ренатурированного лошадиного коллагена I типа, который в тканях макроорганизма подвергается деградации в течение 3–5 нед [12].

На предварительном этапе использовали методику В. Pérez-Köhler и соавт. [13]. Суспензии клеток ночных культур бактерий, стандартизованных до 2 ед. по стандарту McFarland и разведенных 1:100 в бульоне Луриа–Бертани (LB-бульон), засеивали газонном (50 мкл) на LB-агар, раскладывали фрагменты ( $\approx 10 \times 10$  мм) противоспаечного барьера КолГАРА, предварительно погруженные на 10 мин в 0,89% NaCl (контроль), 0,05% водный раствор Хлоргексидина биглюконата и Пронтосан (0,1% ундециленовый амидопропил-бетаин; 0,1% полиаминопропил бигуанида — полигексанид). Концентрация Хлоргексидина биглюконата была выбрана с учетом наиболее частого использования в хирургической практике. Чашки с посевами инкубировали при температуре 37°C в те-

чение 24 ч. Антибактериальную активность оценивали с учетом зон ингибирования роста (ЗИР) бактерий по коэффициенту  $k$ , рассчитанному как отношение площадей в миллиметрах:  $S_{\text{ЗИР}}/S_{\text{фрагмента}}$ .

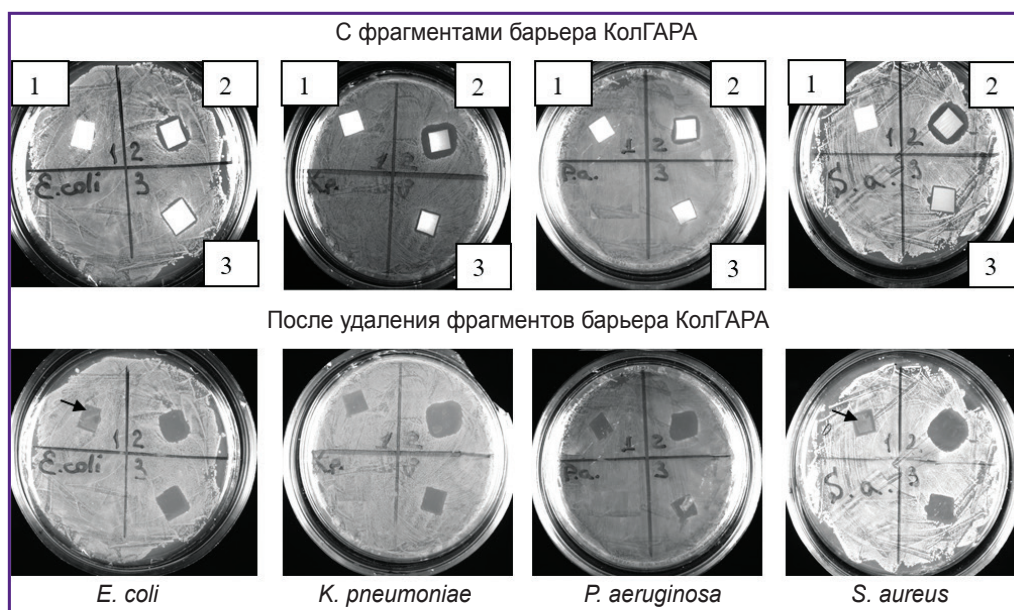
На втором этапе фрагменты мембраны в аналогичных вариантах помещали в лунки 24-луночного плоскодонного полистиролового планшета Corning (Corning, Бельгия) с суспензией (1,0 мл), разведенной 1:100 стандартизированной ночной культурой каждого вида бактерий. Динамику роста микробной популяции контролировали путем измерения оптической плотности клеток на микропланшетном ридере Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, США) при длине волны 630 нм через 24 ч и 6 сут. После экспозиции фрагменты барьера трехкратно отмывали в 5 мл 0,89% NaCl, погружали в 1,0 мл фосфатно-буферной среды и обрабатывали ультразвуком 5 раз в течение 1 мин при 37 кГц, поместив планшеты в ультразвуковую ванну Elma Ultrasonic 30S (Elma, Германия). Бактериальную адгезию оценивали по количеству живых клеток (колониеобразующих единиц, КОЕ/мл) после высева из последовательных десятикратных разведений бактериальных суспензий на LB-агар.

Профили поверхности и адгезию бактерий изучали с помощью атомно-силового микроскопа Asylum MFP-3D-BIO (Asylum Research, США) в лаборатории атомно-силовой и конфокальной микроскопии на базе Rhodococcus-центра Пермского государственного национального исследовательского университета. Сканирование проводили в полуконтактном режиме на воздухе с использованием кремниевого кантилевера AC240TS (Asylum Research, США) с резонансной частотой 50–90 кГц и константой жесткости 0,5–4,4 Н/м. Для характеристики структуры поверхности (шероховатость,  $S_q$ ) и высоты биопленки получали двух- и трехмерные топографические изображения бактерий. Обработку полученных изображений выполняли с помощью программы Igor Pro 6.22A (WaveMetrics, США).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2016 и Statistica 10.0. Показатели представлены в виде среднего арифметического и его ошибки ( $M \pm m$ ). Достоверность различий средних величин определяли с помощью парного  $t$ -критерия Стьюдента, отличий двух независимых выборок — по критерию Манна–Уитни ( $U$ -test). При  $p < 0,05$  делали вывод о наличии статистически значимой разницы между сравниваемыми выборками.

## Результаты

В экспериментах на агаризованной среде выявлено, что без предварительной обработки антисептическими препаратами барьера КолГАРА все исследованные культуры бактерий формировали газонный рост вокруг его фрагментов, а в большин-



**Рис. 1. Зоны ингибирования роста бактериальных культур, создаваемые фрагментами противоспаечного барьера КолГАРА в комбинации с биоцидами:**  
 1 — 0,89% NaCl (контроль); 2 — 0,05% раствор Хлоргексидина биглюконата; 3 — Пронтосан; изображения получены с помощью системы Gel Doc XR+ (Bio-Rad Laboratories, США) и являются репрезентативными для каждой исследованной культуры бактерий при 24-часовом газонном росте на LB-агаре; *стрелками* обозначены зоны бактериальной колонизации под фрагментами мембраны в контрольных вариантах

стве случаев — и под ним (рис. 1). Кратковременная экспозиция барьера с растворами биоцидов приводила к появлению зон ингибирования роста всех протестированных типовых бактериальных штаммов. В табл. 1 представлены данные по коэффициенту  $k$  для барьера КолГАРА в контрольном (0,89% NaCl) и опытных (с антисептическими препаратами) вариантах эксперимента.

В комбинации «барьер КолГАРА + Хлоргексидина биглюконат» антибактериальный эффект наиболее выражен в отношении *S. aureus* ( $k=3,69\pm 1,28$ ), но и для остальных культур отличие от контроля оказалось достоверным. Статистически значимая разница в этой комбинации выявлена только в паре *S. aureus* и *E. coli* ( $U$ -test:  $p=0,0306$ ). При экспозиции фрагмента барьера с Пронтосаном коэффициент  $k$  был существенно меньше, чем в случае Хлоргексидина биглюконата для всех использованных культур. При сравнении антибактериального действия двух антисептиков выявлено, что эффект Хлоргексидина биглюконата был более выраженным, чем у Пронтосана, для всех исследованных штаммов, а для *E. coli* и *S. aureus* — еще и статистически значимым.

Таблица 1

**Коэффициент  $k$ , характеризующий ингибирование роста бактерий в диффузионном тесте с использованием барьера КолГАРА в комбинации с биоцидами**

Культура	Вариант эксперимента*	$k, S_{\text{ЗИР}}/S_{\text{фрагмента}}$	Достоверность отличий (t-критерий Стьюдента)		
			$p_1$	$p_2$	$p_3$
<i>E. coli</i>	0,89% NaCl	$1,02\pm 0,03$			
	Хлоргексидина биглюконат	$2,37\pm 0,35$	0,0002	0,0650	0,0227
	Пронтосан	$1,54\pm 0,56$			
<i>K. pneumoniae</i>	0,89% NaCl	$1,04\pm 0,11$			
	Хлоргексидина биглюконат	$2,31\pm 1,39$	0,0495	0,0310	0,0875
	Пронтосан	$1,45\pm 0,38$			
<i>P. aeruginosa</i>	0,89% NaCl	$1,0\pm 0,0$			
	Хлоргексидина биглюконат	$2,59\pm 0,04$	0,0079	0,0205	0,0722
	Пронтосан	$1,69\pm 0,06$			
<i>S. aureus</i>	0,89% NaCl	$1,0\pm 0,0$			
	Хлоргексидина биглюконат	$3,69\pm 1,28$	0,0036	0,0210	0,0496
	Пронтосан	$2,26\pm 0,93$			

Примечания: \* —  $n=6$  для каждого варианта;  $p_1$  — различия между вариантами «контроль» и «Хлоргексидина биглюконат»;  $p_2$  — между вариантами «контроль» и «Пронтосан»;  $p_3$  — между вариантами «Хлоргексидина биглюконат» и «Пронтосан».

В экспериментах по адгезии бактерий на поверхности противоспаечного барьера КолГАРА в суспензионной культуре получены следующие

Таблица 2

Оптическая плотность бактериальной суспензии и количество жизнеспособных клеток, адгезированных на поверхности барьера КолГАРА в комбинации с биоцидами

Культура	Вариант эксперимента*	Оптическая плотность суспензии, λ=600 нм		Количество прикрепленных клеток, КОЕ/мл	
		Через 24 ч	Через 6 сут	Через 24 ч	Через 6 сут
<i>E. coli</i>	0,89% NaCl	0,823±0,202	1,043±0,103	1,92E+05±2,20E+05	4,63E+05±6,53E+05
	Хлоргексидина биглюконат	0,276±0,167 <sup>+</sup>	0,464±0,399 <sup>+</sup>	0,00E+00±0,00E+00 <sup>+</sup>	4,00E+02±6,93E+02 <sup>+</sup>
	Пронтосан	0,274±0,137 <sup>+</sup>	0,609±0,099 <sup>+</sup>	7,36E+03±5,37E+03 <sup>+</sup>	1,03E+02±1,41E+02 <sup>+</sup>
<i>K. pneumoniae</i>	0,89% NaCl	0,807±0,095	1,153±0,371	7,01E+06±1,13E+07	1,27E+05±1,67E+05
	Хлоргексидина биглюконат	0,161±0,065 <sup>+</sup>	0,177±0,018 <sup>+</sup>	4,32E+03±5,88E+03 <sup>+</sup>	4,08E+03±7,07E+03 <sup>+</sup>
	Пронтосан	0,319±0,116 <sup>+</sup>	0,292±0,227 <sup>+</sup>	4,84E+04±1,76E+04 <sup>+</sup>	2,54E+03±8,31E+03 <sup>+</sup>
<i>P. aeruginosa</i>	0,89% NaCl	1,173±0,241	1,131±0,093	1,88E+06**	—
	Хлоргексидина биглюконат	1,063±0,685	1,002±0,103	1,18E+04**	—
	Пронтосан	1,052±0,424	1,112±0,423	5,05E+06**	—
<i>S. aureus</i>	0,89% NaCl	0,999±0,101	0,988±0,613	3,27E+05±1,95E+05	1,14E+06**
	Хлоргексидина биглюконат	0,345±0,193 <sup>+</sup>	0,510±0,189	0,00E+00±0,00E+00 <sup>+</sup>	0,00E+00±0,00E+00 <sup>+</sup>
	Пронтосан	0,461±0,372 <sup>+</sup>	0,440±0,211 <sup>+</sup>	0,00E+00±0,00E+00 <sup>+</sup>	0,00E+00±0,00E+00 <sup>+</sup>

Примечания: \* — n=3 для каждого варианта; <sup>+</sup> — статистическая значимость различий значений с соответствующим контролем (0,89% NaCl); \*\* — представлены данные одного эксперимента.

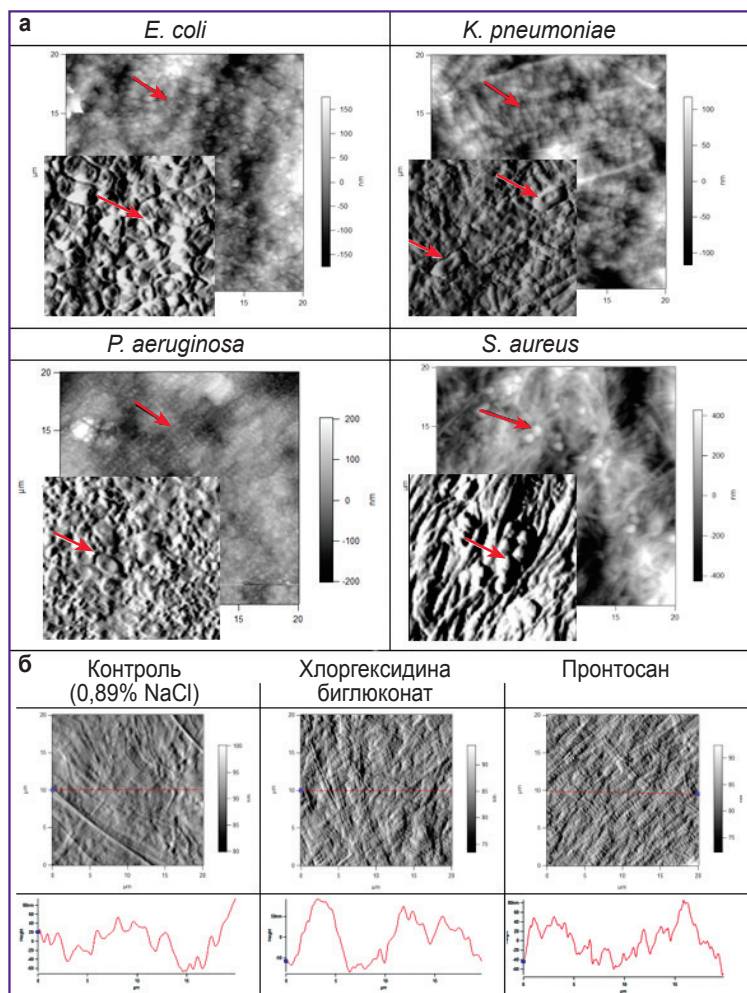


Рис. 2. Изображения поверхности участка противоспаечного барьера КолГАРА, полученные методом атомно-силовой микроскопии: а — после 24-часовой экспозиции с бактериальными суспензиями референтных штаммов (стрелками указаны клетки бактерий); б — после 10-минутной экспозиции в растворах биоцидов; на графиках представлены результаты профилометрии поверхности в направлении, обозначенном красной линией на фото

данные. В присутствии фрагментов мембраны, пропитанной антисептиками, показатель оптической плотности суспензии клеток *E. coli*, *K. pneumoniae* и *S. aureus* через 24 ч был статистически значимо меньше, чем в контроле (табл. 2). Рост бактерий *P. aeruginosa* не ингибировался ни в одном из вариантов, при этом в трех из четырех независимых экспериментов фрагменты барьера даже не были обнаружены. Через 6 сут оптическая плотность культур *E. coli* и *K. pneumoniae* в вариантах с биоцидами также была меньше, чем в контроле. К этому сроку коллагеновая мембрана полностью «растворилась» в контрольном варианте с бактериями *S. aureus*.

Прикрепление клеток к поверхности регистрировали через 24 ч для всех представителей микроорганизмов (для *P. aeruginosa* — данные одного эксперимента). В комбинации с Хлоргексидина биглюконатом колонизация мембраны бактериями *E. coli* и *S. aureus* на этот срок не выявлена, а адгезия клеток *K. pneumoniae* была статистически значимо меньше, чем в контроле. Пронтосан оказался менее эффективным: количество прикрепленных к поверхности барьера бактерий семейства *Enterobacteriaceae* составило  $10^3$ – $10^4$  КОЕ/мл. В отношении *S. aureus* антибактериальное действие биоцидов зафиксировано в оба срока экспозиции.

Анализ изображений, полученных с помощью атомно-силовой микроскопии, показал, что через 24 ч на поверхности фрагмента мембраны формировалась биопленка, которая имела структуру плотно прилегающих друг к другу палочек (*E. coli*, *P. aeruginosa*) или кокков (*S. aureus*), либо были видны отдельно адгезированные бактерии (*K. pneumoniae*) (рис. 2, а). Группы клеток стафилококков (диаметр бактерий составлял  $1,10 \pm 0,08$  мкм) интегрированы между дезорганизованными коллагеновыми волокнами. Действительно, показатель *Sq*, характеризующий поверхность биопленки, которая образована бактериями *S. aureus*, составлял  $221,3 \pm 38,6$  нм и был выше в 3,0; 3,8 и 3,6 раза по сравнению с таковым для *E. coli* ( $72,8 \pm 12,6$  нм), *K. pneumoniae* ( $57,5 \pm 21,8$  нм) и *P. aeruginosa* ( $60,8 \pm 22,1$  нм), а также превышал в 4,4 раза данный показатель для мембраны в контроле ( $50,3 \pm 26,3$  нм). Достоверного изменения шероховатости поверхности ( $p > 0,05$ ) после кратковременного воздействия на коллагеновые волокна Хлоргексидина биглюконата ( $Sq = 47,1 \pm 19,3$  нм) и Пронтосана ( $Sq = 52,9 \pm 7,4$  нм) не выявлено (рис. 2, б).

## Обсуждение

Хирургические противоспаечные барьеры на основе натуральных веществ, в частности коллагена, в отличие от синтетических имплантатов обладают биосовместимостью, высокой поверхностной активностью и способностью к биодеградации. Являясь основным белком соединительной ткани, имплан-

тированный во время лапаротомии «чужеродный» коллаген инкорпорируется в окружающие ткани, обеспечивая процесс заживления, реконструкцию и восстановление механической и функциональной целостности брюшной полости [9]. Применяемая в настоящее время технология кросс-линкеров (поперечных швов), стабилизирующих трехмерную структуру волокон, обуславливает устойчивость мембраны к тканевым коллагеназам макроорганизма [14]. К такому типу барьеров относится противоспаечная мембрана КолГАРА, состоящая из ренатурированного лошадиного коллагена I типа. В исследовании, проведенном компанией-производителем, применение мембраны КолГАРА снижало риск образования спаек у хирургических больных более чем в шесть раз, а также статистически значимо уменьшало их распространенность и выраженность при оценке *in vivo* [12]. Продемонстрированы результаты успешного применения данной мембраны при операциях на органах брюшной полости и малого таза и в России [10, 15].

Известно, что коллагеновые волокна положительно влияют на адгезию микробных клеток и способствуют формированию биопленок [16–18]. Прикрепление клеток золотистого стафилококка к коллагену, например, опосредуется коллагенсвязывающим белком (Cna), который является MSCRAMM-фактором (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules — микробные поверхностные компоненты, распознающие адгезивные молекулы матрикса) [19]. *P. aeruginosa* прикрепляется к любым поверхностям, прежде всего посредством пилей 4-го типа, но адгезия к коллагену может осуществляться через механизм, не связанный с пиллями [20]. На поверхности клеток псевдомонад имеется общий коллагенсвязывающий рецептор, который блокируется сахарами, ингибируя присоединение *P. aeruginosa* к коллагену I и II типа [21]. Описан вариант маннозочувствительных фимбрий 1-го типа, в составе адгезина FimH которых присутствует аминокислотный остаток Ala62, необходимый для адгезии на коллагенах I и IV типа ассоциированной с менингитом *E. coli* [22]. Пили 3-го типа *K. pneumoniae* состоят из субъединицы (MrkA) основного белка и адгезина (MrkD), который опосредует связывание клеток с коллагеном IV и/или V типа [23]. Учитывая, что бактериальная адгезия к поверхности внедренного природного полимера, который становится источником питательных субстратов для микроорганизмов, является ключевым этапом формирования биопленок, покрытие имплантата антимикробным препаратом представляет собой перспективную стратегию профилактики имплантат-ассоциированной инфекции [13, 18]. В клинической практике ряда стран предложено непосредственно перед использованием пропитывать или опускать аллостерический имплантат в раствор антибиотиков [24–26], однако эффективность данного способа для снижения риска бактериальных осложнений

при использовании противоспаечных барьеров из натуральных волокон не доказана.

В представленном экспериментальном исследовании *in vitro* оценена адгезия бактерий *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* на хирургической противоспаечной мембране КолГАРА без обработки и в комбинации с Хлоргексидина биглюконатом и Пронтосаном — наиболее часто используемыми в хирургической практике биоцидами. Спектр выбранных микроорганизмов обусловлен данными многочисленных многоцентровых отечественных и зарубежных исследований, в которых определены основные этиопатогены вторичного перитонита [27–29]. В экспериментах по моделированию условий бактериального обсеменения использовали концентрацию бактерий  $10^6$  кл./мл, которая значительно превышает бактериальную нагрузку, необходимую для развития инфекции области хирургического вмешательства [30], — подобная модель является обычной практикой для изучения бактериальной адгезии *in vitro*.

Предварительные результаты, полученные на агаризованной среде, подтвердили антибактериальный эффект протестированных биоцидов, «удерживаемых» волокнами мембраны.

Необходимо отметить, что на все бактериальные культуры влияние Хлоргексидина биглюконата было более выраженным, чем Пронтосана, а в отношении бактерий *E. coli* и *S. aureus* разница была еще и статистически значима. Так, коэффициент *k*, характеризующий степень ингибирования роста бактерий, в варианте с Пронтосаном был самым низким для *E. coli* и *K. pneumoniae*, что согласовывалось с результатами экспериментов в суспензионной культуре: колонизация поверхности бактериями зафиксирована уже через сутки. Закономерно отсутствие адгезированных клеток *S. aureus* на поверхности мембраны, пропитанной обоими биоцидами, — на агаре зоны ингибирования роста и, соответственно, коэффициент *k* были самыми высокими. Следует отметить достоверное снижение оптической плотности клеточной суспензии, зарегистрированное в вариантах с биоцидами для всех культур, за исключением *P. aeruginosa*. При этом через сутки в трех из четырех экспериментов не были обнаружены даже фрагменты противоспаечного барьера КолГАРА, в том числе и пропитанные антисептиками. Учитывая, что *P. aeruginosa* продуцирует несколько протеаз, включая эластазы (LasA и LasB), щелочную протеазу (AprA), недавно описанные новые протеазы — протеазу IV и большую экзопроteaseзу (LepA) — «полное растворение» мембраны за короткий срок вполне объяснимо [31–33]. Кроме того, считается, что распад коллагена происходит преимущественно при нейтральном уровне pH, при котором LasB Zn-связанная металлопротеаза, действующая на многие белки, включая коллаген, находится в условиях функциональной активности [34].

Необходимо отметить, что через шесть дней фрагменты мембраны КолГАРА полностью распались в контрольном варианте с *S. aureus*. По-видимому, колонизация поверхности мембраны клетками *S. aureus* и последующая продукция экстрацеллюлярных цистеиновых протеаз, таких как стафопаины A и B (ScpA и SspB) [35], привела к ее полной деградации. Протеазы с коллагенолитической активностью описаны также для *E. coli* (семейство U32 с неизвестным каталитическим механизмом) и *K. pneumoniae*, но данные ферменты либо имеют низкое сродство к субстрату (субстратную специфичность), либо активны при ином оптимуме температуры и pH [36, 37].

Ранее нами было показано негативное влияние Хлоргексидина биглюконата и Пронтосана на sessильные формы бактерий *S. aureus* и *P. aeruginosa* в смешанном и моновидовых вариантах, которое проявлялось в снижении биомассы биопленки, полиморфизме клеток и потере их жизнеспособности [38]. Биоциды действовали на уже готовые биопленки, и преимущество Пронтосана объяснялось действием амидопропил-бетаина, обладающего свойствами поверхностно-активного вещества, которое разрушает биопленочную структуру, в результате чего бактерицидный компонент действовал очень эффективно. Ожидаемого нами превосходства Пронтосана в данной работе не выявлено, хотя известно [39], что поверхностно-активные вещества ингибируют адгезию бактерий на разных поверхностях. По всей вероятности, концентрируясь на межфазовых поверхностях раздела, амфотерный амидопропил-бетаин образует моно- или полимолекулярный слой, который делает поверхность коллагенового волокна малодоступной к адсорбции другого вещества — полигексанида, обладающего антибактериальной активностью. Антиадгезивный эффект после воздействия Хлоргексидина биглюконата оказался выше, и он не был связан с изменением шероховатости поверхности, так как рельеф и показатель *Sq* статистически значимо не отличались.

Принципиальная возможность применения противоспаечных барьеров в условиях бактериальной контаминации зоны оперативного вмешательства показана ранее [40], однако целесообразность такого подхода в отношении коллагеновых и сочетанных с коллагеном мембран не всем представляется однозначной. Известно, что коллаген может стимулировать адгезию к поверхности мембраны и прилегающим тканям как бактерий, так и клеток хозяина, что получило название «гонки на поверхности» [41]. Кроме того, инфицирование брюшной полости инициирует синтез матриксных металлопротеиназ (интерстициальной коллагеназы ММП-1, коллагеназы нейтрофильных гранулоцитов ММП-8 и др.) в большинстве клеток соединительной ткани, фибробластах и макрофагах, что способствует ферментативному расщеплению коллагена [9]. Деградация коллагена усиливается в случае контаминации бактериями — продуцентами протеаз с коллагеназной активностью.

Эти и другие аспекты определяют противопоказания для использования коллагеновых мембран в условиях инфицирования зоны оперативного вмешательства. Эффективность антимикробного покрытия противоспаечных барьеров для контроля бактериальных инфекций не считается окончательно доказанной, в том числе и для коллагеновых или других природных хирургических мембран.

Полученные в ходе проведенного исследования результаты показали, что бактерии *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, являющиеся ведущими возбудителями абдоминальной хирургической инфекции, в течение суток адгезируются на поверхности противоспаечного барьера КолГАРА. Использование атомно-силовой микроскопии позволило оценить морфологию и структурные особенности биопленок, сформированных на коллагеновой мембране представителями разных таксонов. Адсорбция биоцида на поверхности фрагмента барьера после его кратковременной экспозиции в растворе Хлоргексидина биглюконата и Пронтозана обуславливает ингибирование роста и прикрепления клеток типовых штаммов бактерий (за исключением *P. aeruginosa*). Факт отсутствия антибактериального/антиадгезивного действия антисептиков в отношении *P. aeruginosa* связан с продукцией многочисленных протеаз с коллагеназной активностью. Разница между биоцидами в ингибировании адгезии бактерий к мембране не связана с изменением шероховатости ее поверхности.

Экспериментальная модель *in vitro* не позволяет предсказать, как покрытые антисептиком коллагеновые мембраны будут вести себя *in vivo* в условиях абдоминальной хирургической инфекции. Необходимы дальнейшие экспериментальные и клинические исследования, которые позволят оценить возможность применения противоспаечных барьеров на основе натуральных веществ в сочетании с биоцидами для профилактики спаечной болезни у пациентов с риском развития перитонита, а также выявить роль антимикробного покрытия мембраны в процессах ее интеграции и регенерации тканей.

## Заключение

Волокна коллагена с абсорбированными интраоперационно антисептиками могут содействовать поступлению биоцидов в окружающие ткани в послеоперационном периоде и эрадикации возбудителей инфекции. В связи с этим пропитывание хирургической противоспаечной мембраны антибактериальными соединениями непосредственно перед началом имплантации представляет собой перспективную стратегию для профилактики инфекций области хирургического вмешательства.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность академику РАН, д.б.н., профессору, зав. лаборато-

рией ЛАМ ИЭГМ УрО РАН И.Б. Ившиной и сотрудникам лаборатории атомно-силовой и конфокальной микроскопии на базе Rhodococcus-центра Пермского государственного национального исследовательского университета к.б.н. И.О. Коршуновой и О.Н. Писцовой за помощь в проведении атомно-силовой микроскопии.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках Государственного заказа на 2018–2020 гг. «Междисциплинарное комплексное клинично-экспериментальное исследование современных хирургических технологий в лечении пациентов с вентральными грыжами».

**Конфликт интересов.** У авторов нет конфликта интересов.

## Литература/References

1. Кондратович Л.М. Основы понимания формирования спаечного процесса в брюшной полости. Интраоперационная профилактика противоспаечными барьерными препаратами (обзор литературы). Вестник новых медицинских технологий 2014; 21(3): 169–173. Kondratovich L. The basics for comprehension of adhesive process formation in abdominal cavity. Perioperative prevention by means of anti-adhesive drugs (review of literature). *Journal of New Medical Technologies* 2014; 21(3): 169–173, <https://doi.org/10.12737/5929>.
2. Назаренко А.А., Акимов В.П. Преодоление адгезиогенеза. Медицинский вестник юга России 2014; 4: 15–18. Nazarenko A.A., Akimov V.P. Overcoming of adhesiogenesis. *Medical Herald of the South of Russia* 2014; 4: 15–18.
3. Аюшинова Н.И., Шурьгина И.А., Шурьгин М.Г., Панасюк А.И. Современные подходы к профилактике спаечного процесса в брюшной полости. Сибирский медицинский журнал (Иркутск) 2011; 105(6): 16–20. Ayushinova N.I., Shurygina I.A., Shurygin M.G., Panasuk A.I. Contemporary approaches to the prevention of intraperitoneal adhesions. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal* 2011; 105(6): 16–20.
4. Снегирев И.В., Миронов В.И., Башлыков Д.В. Острая кишечная непроходимость неопухолевого генеза: диагностика и лечение. Сибирский медицинский журнал 2010; 99(8): 163–165. Snegirev I.I., Mironov V.I., Bashlykov D.V. Nontumoral acute ileus: diagnosis and treatment. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal* 2010; 99(8): 163–165.
5. Bilsel Y., Abci I. The search for ideal hernia repair; mesh materials and types. *Int J Surg* 2012; 10(6): 317–321, <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2012.05.002>.
6. Brochhausen C., Schmitt V.H., Planck C.N., Rajab T.K., Hollemann D., Tapprich C., Krämer B., Wallwiener C., Hierlemann H., Zehbe R., Planck H., Kirkpatrick C.J. Current strategies and future perspectives for intraperitoneal adhesion prevention. *J Gastrointest Surg* 2012; 16(6): 1256–1274, <https://doi.org/10.1007/s11605-011-1819-9>.
7. Кос О., Duran B., Topcuoglu A., Bugdayci G., Yilmaz F., Dönmez M. Intraperitoneal administration of single dose type I collagen or low dose melatonin to prevent intraperitoneal adhesion formation: a comparative study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 145(2): 209–213, <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2009.05.019>.
8. Sullivan E.K., Kamstock D.A., Turner A.S., Goldman S.M., Kronengold R.T. Evaluation of a flexible



collagen surgical patch for reinforcement of a fascial defect: experimental study in a sheep model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008; 87(1): 88–94, <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31073>.

9. Lee C.H., Singla A., Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm* 2001; 221(1–2): 1–22, [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(01\)00691-3](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(01)00691-3).

10. Горский В.А., Сивков А.С., Агапов М.А., Титков Б.Е., Щадский С.О. Первый опыт интраабдоминального использования однослойной коллагеновой пластины. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова* 2015; 5: 59–61. Gorskiy V.A., Sivkov A.S., Agapov M.A., Titkov B.E., Schadschij S.O. The first experience of using a single-layer intra-abdominal collagen plate. *Khirurgiia. Zhurnal im. N.I. Pirogova* 2015; 5: 59–61, <https://doi.org/10.17116/hirurgia2015559-61>.

11. Schönleben F., Reck T., Tannapfel A., Hohenberger W., Schneider I. Collagen foil (TissuFoil E) reduces the formation of adhesions when using polypropylene mesh for the repair of experimental abdominal wall defects. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21(8): 840–846, <https://doi.org/10.1007/s00384-006-0091-z>.

12. Руководство по эксплуатации изделия медицинского назначения «Барьер (мембрана) рассасывающийся коллагеновый противоспаечный КолГАРА». 2013. *Instruction manual for medical device “KolGARA absorbable adhesion prevention collagen barrier (membrane)”*. 2013.

13. Pérez-Köhler B., García-Moreno F., Bayon Y., Pascual G., Bellón J.M. Inhibition of Staphylococcus aureus adhesion to the surface of a reticular heavyweight polypropylene mesh soaked in a combination of chlorhexidine and allicin: an in vitro study. *PLoS One* 2015; 10(5): e0126711, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126711>.

14. Liang H.-C., Chang Y., Hsu C.-K., Lee M.-H., Sung H.-W. Effects of crosslinking degree of an acellular biological tissue on its tissue regeneration pattern. *Biomaterials* 2004; 25(17): 3541–3552, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.109>.

15. Силуянов С.В., Алиев С.Р. Первый опыт применения противоспаечной коллагеновой мембраны при операциях на органах брюшной полости и малого таза. *Русский медицинский журнал* 2015; 23(13): 789–795. Siluyanov S.V., Aliev S.R. First experience in the use of adhesion prevention collagen membrane during abdominal and pelvic surgery. *Russkij medicinskij zhurnal* 2015; 23(13): 789–795.

16. Birkenhauer E., Neethirajan S., Weese J.S. Collagen and hyaluronan at wound sites influence early polymicrobial biofilm adhesive events. *BMC Microbiology* 2014; 14(1): 191, <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-191>.

17. García-Pumarino R., Pascual G., Rodríguez M., Pérez-Köhler B., Bellón J.M. Do collagen meshes offer any benefits over preclude® ePTFE implants in contaminated surgical fields? A comparative in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2014; 102(2): 366–375, <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33015>.

18. Trafny E.A., Kowalska K., Grzybowski J. Adhesion of Pseudomonas aeruginosa to collagen biomaterials: effect of amikacin and ciprofloxacin on the colonization and survival of the adherent organisms. *J Biomed Mater Res* 1998; 41(4): 593–599, [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(19980915\)41:4<593::aid-jbm11>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(19980915)41:4<593::aid-jbm11>3.0.co;2-g).

19. Clarke S.R., Foster S.J. Surface adhesins of Staphylococcus aureus. *Adv Microb Physiol* 2006; 51: 187–224, [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(06\)51004-5](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(06)51004-5).

20. Plotkowski M.C., Chevillard M., Pierrot D., Altemayer D., Zahm J.M., Colliot G., Puchelle E. Differential adhesion of Pseudomonas aeruginosa to human respiratory epithelial cells in primary culture. *J Clin Invest* 1991; 87(6): 2018–2028, <https://doi.org/10.1172/jci115231>.

21. Stepińska M., Trafny E.A. Modulation of Pseudomonas aeruginosa adherence to collagen type I and type II by carbohydrates. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995; 12(3–4): 187–194, [https://doi.org/10.1016/0928-8244\(95\)00066-6](https://doi.org/10.1016/0928-8244(95)00066-6).

22. Poultu R., Puustinen T., Virkola R., Hacker J., Klemm P., Korhonen T.K. Amino acid residue Ala-62 in the FimH fimbrial adhesion is critical for the adhesiveness of meningitis-associated Escherichia coli to collagens. *Mol Microbiol* 1999; 31(6): 1747–1757, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01311.x>.

23. Rêgo A.T., Johnson J.G., Gelbel S., Enguita F.J., Clegg S., Waksman G. Crystal structure of the MrkD1P receptor binding domain of Klebsiella pneumoniae and identification of the human collagen V binding interface. *Mol Microbiol* 2012; 86(4): 882–893, <https://doi.org/10.1111/mmi.12023>.

24. Sadava E.E., Krpata D.M., Gao Y., Novitsky Y.W., Rosen M.J. Does presoaking synthetic mesh in antibiotic solution reduce mesh infections? An experimental study. *J Gastrointest Surg* 2013; 17(3): 562–568, <https://doi.org/10.1007/s11605-012-2099-8>.

25. Wiegering A., Sinha B., Spor L., Klinge U., Steger U., Germer C.T., Dietz U.A. Gentamicin for prevention of intraoperative mesh contamination: demonstration of high bactericide effect (in vitro) and low systemic bioavailability (in vivo). *Hernia* 2014; 18(5): 691–700, <https://doi.org/10.1007/s10029-014-1293-x>.

26. Yabanoğlu H., Arer İ.M., Çaliskan K. The effect of the use of synthetic mesh soaked in antibiotic solution on the rate of graft infection in ventral hernias: a prospective randomized study. *Int Surg* 2015; 100(6): 1040–1047, <https://doi.org/10.9738/intsur-d-14-00304.1>.

27. Абдоминальная хирургическая инфекция (классификация, диагностика, антимикробная терапия). Российские национальные рекомендации. Под ред. Савельева В.С., Гельфанда Б.Р. М: ООО «Компания Боргес»; 2011. *Abdominal'naya khirurgicheskaya infektsiya (klassifikatsiya, diagnostika, antimikrobnaya terapiya). Rossiyskie natsional'nye rekomendatsii* [Abdominal surgical infection. Russian national recommendations]. Pod red. Savel'eva V.S., Gel'fanda B.R. [Savel'ev V.S., Gel'fand B.R. (editors)]. Moscow: ООО “Kompaniya Borges”; 2011.

28. Morrissey I., Hackel M., Badal R., Bouchillon S., Hawser S., Biedenbach D. A review of ten years of the study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART) from 2002 to 2011. *Pharmaceuticals* 2013; 6(11): 1335–1346, <https://doi.org/10.3390/ph6111335>.

29. Sartelli M., Catena F., Ansaloni L., Coccolini F., Corbella D., Moore E.E., Malangoni M., Velmahos G., Coimbra R., Koike K., Leppaniemi A., Biffi W., Balogh Z., Bendinelli C., Gupta S., Kluger Y., Agresta F., Di Saverio S., Tugnoli G., Jovine E., Ordóñez C.A., Whelan J.F., Fraga G.P., Gomes C.A., Pereira G.A., Yuan K.C., Bala M., Peev M.P., Ben-Ishay O., Cui Y., Marwah S., Zachariah S., Wani I., Rangarajan M., Sakakushev B., Kong V., Ahmed A., Abbas A., Gonsaga R.A., Guercioni G., Vettoretto N., Poiasina E., Díaz-Nieto R., Massalou D., Skrovina M., Gerych I., Augustin G., Kenig J., Khokha V., Tranà C., Kok K.Y.,

- Mefire A.C., Lee J.G., Hong S.K., Lohse H.A., Ghnam W., Verni A., Lohsiriwat V., Siribumrungwong B., El Zalabany T., Tavares A., Baiocchi G., Das K., Jarry J., Zida M., Sato N., Murata K., Shoko T., Irahara T., Hamedelneel A.O., Naidoo N., Adesunkanmi A.R., Kobe Y., Ishii W., Oka K., Izawa Y., Hamid H., Khan I., Attri A., Sharma R., Sanjuan J., Badiel M., Barnabé R. Complicated intra-abdominal infections worldwide: the definitive data of the CIAOW Study. *World J Emerg Surg* 2014; 9(1): 37, <https://doi.org/10.1186/1749-7922-9-37>.
30. Sanders D.L., Kingsnorth A.N., Lambie J., Bond P., Moate R., Steer J.A. An experimental study exploring the relationship between the size of bacterial inoculum and bacterial adherence to prosthetic mesh. *Surg Endosc* 2013; 27(3): 978–985, <https://doi.org/10.1007/s00464-012-2545-4>.
31. Caballero A., Thibodeaux B., Marquart M., Traidej M., O’Callaghan R. Pseudomonas keratitis: protease IV gene conservation, distribution, and production relative to virulence and other Pseudomonas proteases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(2): 522–530, <https://doi.org/10.1167/iovs.03-1050>.
32. Kida Y. Roles of Pseudomonas aeruginosa-derived proteases as a virulence factor. *Nihon Saikingaku Zasshi* 2013; 68(4): 313–323, <https://doi.org/10.3412/jsb.68.313>.
33. Leidal K.G., Munson K.L., Johnson M.C., Denning G.M. Metalloproteases from Pseudomonas aeruginosa degrade human RANTES, MCP-1, and ENA-78. *J Interferon Cytokine Res* 2003; 23(6): 307–318, <https://doi.org/10.1089/107999003766628151>.
34. Bailey A.J. The fate of collagen implants in tissue defects. *Wound Repair Regen* 2000; 8(1): 5–12, <https://doi.org/10.1046/j.1524-475x.2000.00005.x>.
35. Ohbayashi T., Irie A., Murakami Y., Nowak M., Potempa J., Nishimura Y., Shinohara M., Imamura T. Degradation of fibrinogen and collagen by staphopains, cysteine proteases released from Staphylococcus aureus. *Microbiology* 2011; 157(3): 786–792, <https://doi.org/10.1099/mic.0.044503-0>.
36. Suphatharaprateep W., Cheirsilp B., Jongjareonrak A. Production and properties of two collagenases from bacteria and their application for collagen extraction. *N Biotechnol* 2011; 28(6): 649–655, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.04.003>.
37. Zhang Y.Z., Ran L.Y., Li C.Y., Chen X.L. Diversity, structures, and collagen-degrading mechanisms of bacterial collagenolytic proteases. *Appl Environ Microbiol* 2015; 81(18): 6098–6107, <https://doi.org/10.1128/aem.00883-15>.
38. Кузнецова М.В., Еньчева Ю.А., Самарцев В.А. Влияние хлоргексидина и Пронтосана на смешанную и моновидовые биопленки, образованные Staphylococcus aureus и Pseudomonas aeruginosa. Антибиотики и химиотерапия 2015; 60(11–12): 15–22. Kuznetsova M.V., Encheva Yu.A., Samartsev V.A. Influence of chlorhexidine and prontosan on dual species and monospecies biofilms formed by Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. *Antibiotiki i khimioterapiya* 2015; 60(11–12): 15–22.
39. Pirog T.P., Konon A.D., Beregovaya K.A., Shulyakova M.A. Antiadhesive properties of the surfactants of Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241, Rhodococcus erythropolis IMB Ac-5017, and Nocardia vaccinii IMB B-7405. *Microbiology* 2014; 83(6): 732–739, <https://doi.org/10.1134/s0026261714060150>.
40. Паршиков В.В., Самсонов А.А., Романов Р.В., Самсонов А.В., Градусов В.П., Треушников В.В., Успенский И.В., Сорокина О.В. Оперативное лечение ущемленных грыж с применением сетчатых эндопротезов. Нижегородский медицинский журнал 2008; 6: 19–22. Parshikov V.V., Samsonov A.A., Romanov R.V., Samsonov A.V., Gradusov V.P., Treushnikov V.V., Uspenskiy I.V., Sorokina O.V. Operative treatment of strangulated hernias with a use of reticular endoprotheses. *Nizhegorodskij medicinskij zurnal* 2008; 6: 19–22.
41. Gristina A.G., Naylor P., Myrvik Q. Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. *Med Prog Technol* 1988; 14(3–4): 205–224.