

The highest frequency of dysbiotic disorders was determined in patients with various pathologies of the intestinal tract – 47,6% and the stomach – 35,9% of cases. The lowest number of cases of dysbiosis was recorded in patients with liver – 9% and pancreas diseases – 13,1%. According to the results of the comparative analysis, among all tested patients with various intestinal lesion dysbiotic conditions were most often detected in people of the second age group – 57,2%.

All isolated strains were characterized by high sensitivity to most antibiotics. The most active antibiotic against *S. aureus* was imipenem, to which all strains were sensitive, and gatifloxacin and rifampicin, to which 92,1 and 78,9% of strains were sensitive, respectively. The isolated strains of *E. coli* were sensitive to ciprofloxacin, cefuroxime, cefotaxime, cefoperazone, cefepime, polymyxin and levofloxacin. *Proteus* spp. strains showed the highest sensitivity to ciprofloxacin, amikacin, cefotaxime and cefepime, and resistance to doxycycline. The isolated strains of *Enterococcus* spp. were sensitive to linezolid and ampicillin, and resistant to norfloxacin, ciprofloxacin, co-trimoxazole, and aztreonam. All strains of *Clostridium* spp. were sensitive to metronidazole, vancomycin, and amoxicillin/clavulanate. More than 90% of the strains were resistant to penicillin, and 58,1% of them – to imipenem.

Key words: intestinal dysbiosis, opportunistic microbiota, associative symbiotic microbiota, age categories, antibiotic sensitivity.

ORCID and contributionship / ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Lazurenko K. A.: <https://orcid.org/0009-0000-0996-586X>^{BD}

Trofymenko I. O.: <https://orcid.org/0009-0006-5829-1324>^{BD}

Gavryliuk V. G.: <https://orcid.org/0000-0003-0112-3275>^{AD}

Kurahina N. V.: <https://orcid.org/0000-0001-7184-2836>^{DE}

Lavrentieva K. V.: <https://orcid.org/0000-0002-2711-7968>^{CE}

Sklyar T. V.: <https://orcid.org/0000-0003-0224-2460>^{AF}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Kurahina Nina Volodymyrivna / Курагіна Ніна Володимирівна

Oles Honchar Dnipro National University / Дніпровський національний університет ім. Олеся Гончара

Address: Ukraine, 49000, Dnipro, 9 Naukova st / Адреса: Україна, 49000, м. Дніпро, вул. Наукова 9

Tel.: +380973638841 / Тел.: +380973638841

E-mail: microviro@ukr.net

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Received 19.01.2025 / Стаття надійшла 19.01.2025 року

Accepted 29.04.2025 / Стаття прийнята до друку 29.04.2025 року

DOI 10.29254/2077-4214-2025-2-177-401-415

UDC 616-089.843:578.2:616-002-022.7:616.7

¹Poniatovskiy V. A., ¹Shyrobokov V. P., ²Linenko O. M., ²Liutko O. B.

**PROSPECTS FOR THE USE OF AUTOLOGOUS FIBRIN GLUE WITH BACTERIOPHAGES
IN TRAUMATOLOGY AND ORTHOPEDICS**

¹Bogomolets National Medical University (Kyiv, Ukraine)

²SI «Institute of Traumatology and Orthopedics of the National Academy
of Medical Sciences of Ukraine» (Kyiv, Ukraine)

v.poniatovskiy@gmail.com

Injectable platelet-rich fibrin glue (i-PRF) is an autologous platelet concentrate with fibrin fibers, widely used in various fields of medicine and recognized as a valuable adjunct for tissue regeneration during surgical procedures. In addition, i-PRF can serve as a vehicle for the local delivery and depot of antibacterial agents. The incorporation of bacteriophages into fibrin glue may offer an additional tool in the fight against antibiotic-resistant microbial strains.

The aim of the study is to assess the biocompatibility and stability of various types of bacteriophages incorporated into polymerized i-PRF, to study the dynamics of their release from fibrin scaffolds, and to determine the infectious activity of desorbed bacteriophages.

A high-concentration bacteriophage cocktail ($\geq 10^{10}$ PFU/mL) containing different types of bacteriophages was prepared using ultrafiltration. The injectable autologous fibrin glue was polymerized in the presence of the prepared phage cocktail, after which fibrin blocks were placed in saline and incubated at 36 ± 1 °C for 7 days to enable bacteriophage desorption. At designated time points, the concentration of desorbed phages in the saline solution was quantified, and their lytic activity was evaluated.

Fibrin glue polymerized in the presence of the bacteriophage cocktail targeting five bacterial species consistently released all phage types over a 7-day incubation period in liquid medium at 36±1 °C. Using the agar overlay method, it was confirmed that the desorbed bacteriophages caused specific lysis of all five tested microorganisms (Escherichia coli, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Streptococcus pyogenes) throughout the observation period.

The findings support the feasibility of using injectable autologous fibrin glue as a matrix for sustained local delivery of bacteriophages. This approach holds promise for the prevention and treatment of infectious complications in traumatology and orthopedics.

Key words: fibrin glue, i-PRF (injectable Platelet-Rich Fibrin), bacteriophages, local depot of antibacterial agents.

Connection of the publication with planned research works.

The presented work is a fragment of scientific research within the framework of the initiative research work “The use of bacteriophages to counteract antibiotic-resistant variants of *Klebsiella pneumoniae*”, state registration number O123U100951.

Introduction.

Traumatic open injuries to human bones are frequently accompanied by bacterial contamination, which significantly complicates the correction of bone defects and the restoration of functional integrity in the affected areas. In addition, one of the pressing issues in modern traumatology and orthopedics is the development of postoperative infections due to the partial biocompatibility of artificial implants with the patient's body.

Recent studies report a high incidence of infections (2.8-40.5%) in cases of open fractures with multiple bone fragments, wound contamination, bone tissue loss, extensive soft tissue injury, and associated vascular damage [1]. According to various studies, the rate of infectious complications following elective surgeries of the foot and ankle is approximately 2.1% [2]. Surgical site infections (SSIs) after traumatic orthopedic interventions in elderly patients occur in 2.7% of cases [3]. The incidence of infections following hip and knee arthroplasty ranges from 0.5% to 4% [4]. Periprosthetic joint infections are observed in 0.5-3% of all implanted prostheses, with this rate increasing to 20% in revision surgeries [5].

From an epidemiological perspective, postoperative infectious complications represent a significant challenge, particularly as the global use of orthopedic implants continues to rise. The number of implant procedures increases by approximately 5% annually, and by 2030, the volume of hip and knee revision surgeries is expected to increase by 137% and 601%, respectively. Currently, around 700,000 prosthetic implantations are performed annually in Europe [5, 6].

Problems associated with bacteria exhibiting various degrees of antibiotic resistance, combined with the limitations of systemic antibiotic delivery – such as subtherapeutic concentrations in target tissues due to impaired vascularization and poor perfusion – can lead to treatment failure of musculoskeletal infections. Therefore, there has been growing interest in the development of effective local antimicrobial delivery systems to prevent and treat infections in surgical areas. The design and study of drug delivery carriers capable of forming local depots with prolonged release profiles may reduce adverse effects, enhance treatment efficacy, and open new therapeutic avenues.

To this end, various natural and synthetic materials are actively studied and utilized for local antibiotic delivery. Among them are antibiotic-loaded bone cements

(ALBC) [7], collagen sponges impregnated with antibiotics [8], polymethyl methacrylate (PMMA) materials [9], and bioresorbable injectable hydrogels with antibiotics [10]. The release of antimicrobials from these matrices can occur through various mechanisms: diffusion from an intact matrix, matrix degradation along with drug release, or osmotic pressure-driven displacement.

A promising material for local antimicrobial delivery is Platelet-Rich Fibrin (PRF). PRF is an autologous fibrin glue derived from the patient's blood, commonly used intraoperatively and for the treatment of infected wounds. It consists of a fibrin matrix enriched with platelets, growth factors, chemokines, and leukocytes, which enhance wound healing and provide localized antimicrobial protection [11]. When combined with antibiotics, PRF provides a prolonged antibacterial effect [12]. Studies have demonstrated that PRF releases several growth factors such as Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth Factor (TGF), and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), with sustained release at the implantation site over 10 days. By increasing the local concentration of these factors, PRF facilitates tissue regeneration [13]. PRF is commonly used in combination with bone grafting materials to accelerate healing and promote bone regeneration. Due to its biological properties, PRF is applied in restorative dentistry, orthopedics, maxillofacial and plastic surgery, the treatment of deep surgical site infections, and chronic diabetic ulcers [11, 14, 15, 16].

Injectable Platelet-Rich Fibrin (i-PRF) is a recent innovation in the PRF family. It remains in a liquid state for 10-15 minutes after centrifugation and gradually polymerizes into a fibrin clot [17]. As an autologous material, i-PRF reduces the risk of adverse immune reactions. Its ability to bind with bone graft materials makes it a viable alternative to PRP (platelet-rich plasma) as a platelet concentrate for bone regeneration [18]. The i-PRF procedure involves drawing a small volume of the patient's blood – similar to routine blood sampling – and processing it by specialized centrifugation to isolate the platelet-rich plasma and fibrin components. The resulting i-PRF preparation is then applied directly to the target area requiring regeneration. In cases of extensive bone defects, the application of i-PRF mixed with graft materials has proven to be an effective strategy [19].

Another critical concern related to postoperative infections is the global rise in antimicrobial resistance (AMR) among clinically significant pathogens, coupled with a decline in the development of novel antimicrobial agents. In the United States alone, more than 2.8 million infections caused by antimicrobial-resistant organisms occur annually. According to the 2019 CDC report, over 35000 deaths each year in the U.S. are attributed to infections caused by resistant microorganisms [20].

Therefore, to combat antibiotic resistance and improve treatment outcomes, innovative antimicrobial strategies are urgently needed.

One such promising adjunctive approach involves the use of bacteriophages – viruses that specifically target and lyse bacterial cells without affecting the host's normal flora. Recent *in vitro* and *in vivo* studies demonstrate high efficacy of bacteriophages against drug-resistant pathogens [21, 22, 23]. Phage cocktails have also shown potential in treating infectious complications in orthopedics and traumatology [24, 25].

The aim of the study.

To investigate the feasibility of using autologous i-PRF fibrin glue combined with a polyvalent bacteriophage preparation for local antimicrobial delivery and depot formation.

Object and research methods.

Phage Preparation. To prepare the phage cocktail, bacteriophages from the collection of the Department Microbiology and parasitology with the basics of immunology at Bogomolets National Medical University were used. The phages were isolated from environmental sources using standard methods [26]. The cocktail used in the study included phages active against the following microorganisms: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Streptococcus pyogenes*. The selection of these phages was based on their inclusion in the commercial polyvalent phage preparation “Piophage,” which is used to treat bacterial infections in Eastern European countries. In Ukraine, this preparation is classified as a medicinal product and is approved for medical use.

To obtain the individual components of the cocktail, overnight broth cultures of the respective bacteria and stock solutions of the bacteriophages were added to 250 ml Erlenmeyer flasks containing 200 ml of nutrient broth (HIMEDIA®). The mixtures were incubated at 37°C for 18-24 hours.

After incubation, bacterial debris was removed by filtration through a 0.22 µm Millex® syringe filter (Merck Millipore, Germany), and the resulting monophages were combined to create the cocktail.

To achieve high phage concentrations in the fibrin blocks, the phage cocktail was further subjected to ultrafiltration using a Sartoflow® Smart system with a 100 kDa molecular weight cut-off membrane, resulting in titers of at least 10¹⁰ PFU/ml for each phage.

Phage Titration. To determine the concentration of bacteriophages in the solutions, the classical Gratia method was used, which enables quantitative enumeration of phage particles. Nutrient agar (HIMEDIA®) was used as the medium for titration. Phage titers were expressed in PFU/ml and, for convenience, converted into logarithmic values (Log₁₀).

Test Cultures. Five indicator bacterial strains were used, obtained from the Ukrainian collection of microorganisms of the D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Proteus mirabilis* (B-7500), *Proteus vulgaris* (B-7501), *Pseudomonas aeruginosa* (B-7505), and *Streptococcus pyogenes* (B-7507).

Tryptic soy agar and broth (Merck) were used for bacterial cultivation.

Scanning Electron Microscopy (SEM). SEM was performed at the Center for Collective Use of Electron Microscopy of the M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine. A JSM-6060 LA scanning electron microscope (JEOL, Japan) was used. Samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde solution. Sputter coating with gold was carried out using the JFC-1600 ion sputter coater.

Transmission Electron Microscopy (TEM). Formvar-coated grids were used to prepare support films. Samples were negatively stained with 2% phosphotungstic acid (pH 6.8) for 1-2 minutes. Phage samples were applied dropwise to the support films. The grids used were 230 mesh. Prepared specimens were examined using a JEM 1230 transmission electron microscope.

Preparation of Autologous Fibrin Glue (i-PRF). To prepare i-PRF, 10 ml of whole blood was collected without anticoagulant and centrifuged at 700 rpm for 3 minutes at room temperature. During this time, erythrocytes partially settled at the bottom, while the plasma in the upper part of the tube remained liquid and had not yet coagulated. The upper layer of the liquid was collected and used as injectable PRF (i-PRF) [27].

Following plasma separation from the formed elements, it was mixed with bacteriophages using a syringe in a ratio of 0.5 ml phage concentrate to 2.5 ml of blood plasma, and the mixture was left at room temperature to allow fibrin clot formation (fig. 1).

Once the clot had formed, it was separated into serum and the fibrin matrix proper.



Figure 1 – Formation of the fibrin scaffold.

Phage Desorption. To study the desorption process of phages, the fibrin matrix was immersed in 3 ml of physiological saline and incubated at 36 ± 1 °C for 7 days. At specific time intervals (1, 2, 3, 6, and 24 hours, as well as on days 2, 3, 4, 5, 6, and 7), the supernatant was replaced: the existing solution containing desorbed phages was removed and replaced with fresh saline. The concentration of bacteriophages was determined in each eluate. Additionally, throughout the entire experimental period, the condition of the fibrin blocks was visually monitored.

Research results and their discussion.

Determination of bacteriophage titers in the obtained phage lysates revealed concentrations ranging from 10⁵ to 10⁷ PFU/ml, depending on the type of bacteriophage. Therefore, at the initial stage of the study, the lysates were concentrated to increase the titer to at least 10¹⁰ PFU/ml for each bacteriophage used. This phage concentration is necessary to ensure their effective accumulation at the site of inflammation and thereby enhance therapeutic efficacy, in accordance with current phage therapy approaches. Experimental data confirmed that the use of high phage doses in wound infections signifi-

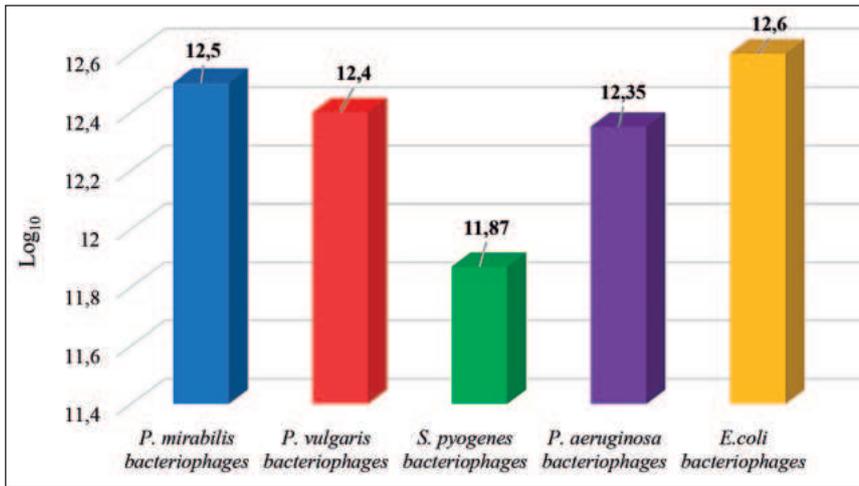


Figure 2 – Content of different bacteriophages in the concentrated phage cocktail after ultrafiltration.

cantly reduces bacterial load more effectively than low doses, and repeated phage administration enables maximal eradication of the pathogen [28].

Following the ultrafiltration stage, the activity of the phage preparation was assessed using the Gratia meth-

od. It was confirmed that the use of filtration membranes with a molecular weight cut-off of 100 kDa allows for the production of a high-titer phage preparation (fig. 2). The use of transmission electron microscopy (TEM) of the obtained concentrate also confirmed the presence of bacteriophages belonging to different morphological groups in the preparation (fig. 3). After quality control of the prepared concentrate, the phage concentrate was mixed with blood plasma at a ratio of 0.5:2.5. The resulting mixture was left at room temperature to allow the formation of a fibrin conglomerate. Within forty minutes, plasma clarification and clear clot formation were observed. Upon completion of the fibrin scaffold formation, the clot was separated from the serum and subjected to further analysis.

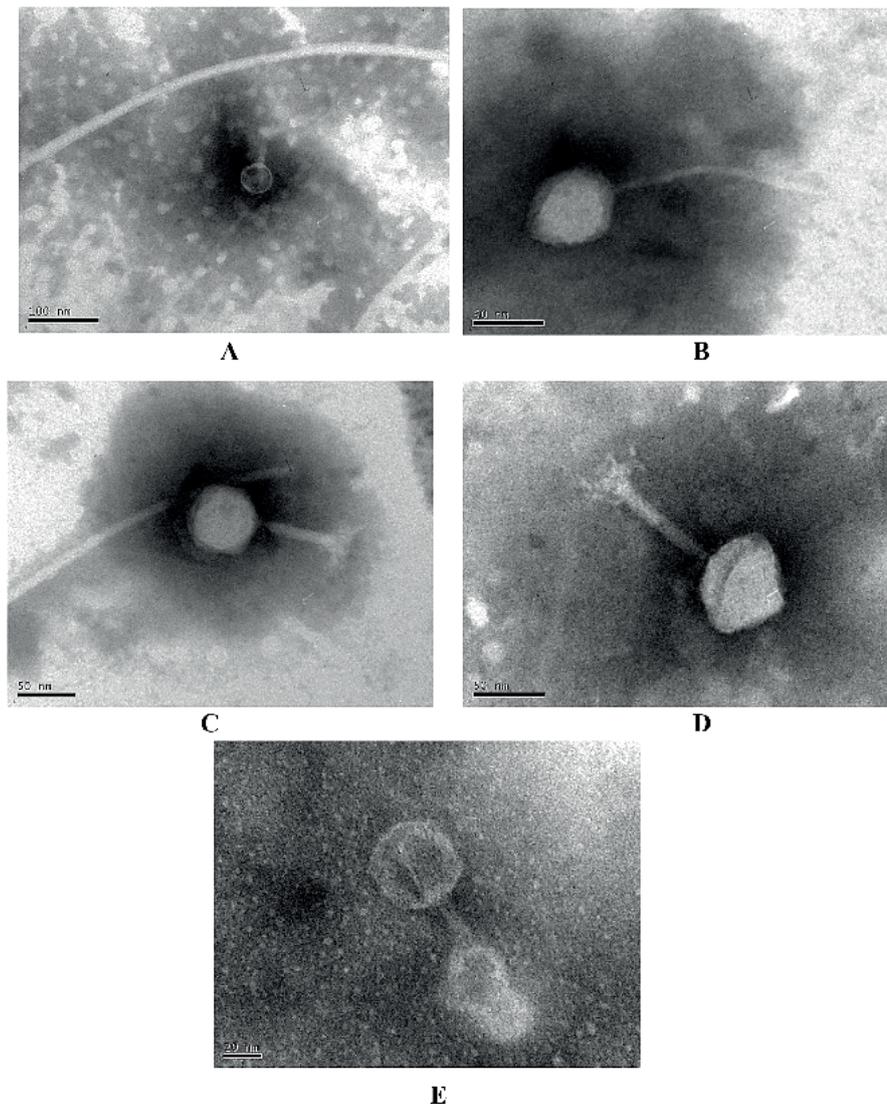


Figure 3 – Transmission electron microscopy of the obtained phage concentrate: A, C, D, E - Myo - like morphotype, B – Siphoviridae-like morphotype.

Determination of phage concentration in the serum showed a considerable amount of bacteriophages possessing infectious activity (ranging from 8.7 to 11.93 log₁₀, depending on the phage). This indicates that a significant portion of viral particles is not adsorbed onto the fibrin fibers of the autologous fibrin glue (fig. 4).

Scanning electron microscopy revealed that the internal structure of the autologous fibrin glue with bacteriophages exhibited a spongy-fibrous architecture with clearly visible fibrin fibers (fig. 5).

To assess the possibility of using autologous fibrin glue as a local depot for bacteriophages, the formed fibrin scaffolds were immersed in physiological saline (0.9% NaCl) and incubated at 36±1°C for one week, with the saline solution being regularly replaced at defined time intervals. The observation period was chosen based on the fact that bacteriophages are antigenic components for the human body, which respond by producing anti-phage antibodies that ultimately neutralize the phages.

The experimental results indicate effective entrapment of bacteriophages within the fibrin matrix, followed by their gradual release into the physiological solution. The release curves demonstrated an initial burst release of phages (a rapid decrease in phage titer within the scaffold), followed by a slower release phase. Already one hour after immersion of the fibrin glue blocks into the saline solution, a significant portion of bacteriophages was released from the clot into the solution, suggesting a substantial presence of phages in the outer layer of the fibrin scaffold. At 3 and 6 hours of incubation, the amount of released phages was approximately ten times lower compared to the first hour (fig. 6).

The highest desorption rate during the initial hours may be associated with the release of phages from the surface layers of the fibrin scaffold, while the slower release at later stages likely reflects diffusion of phages from deeper layers. Differences in concentration between phage types could be attributed to their varying

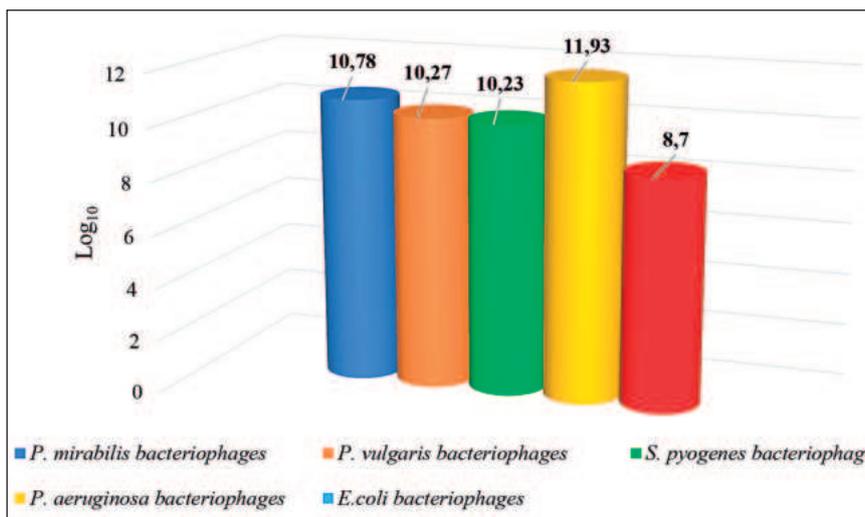


Figure 4 – Bacteriophage content in the serum after fibrin scaffold formation (phage titer expressed as log₁₀ PFU/mL).

affinity to the fibrin matrix or to differences in virion size, which affect diffusion rates.

From the first to the seventh day of observation, gradual degradation of the fibrin scaffold occurred with concurrent release of phages, whose concentration steadily decreased. After the seventh day in the desorption solution, significant phage titers (10² PFU/mL) were recorded, which supports the potential use of fibrin glue with bacteriophages for practical application. This release pattern was consistent for all five phage types used in the study.

During visual observation of the fibrin clot throughout the study period, it was noted that the clot gradually decreased in size. Complete disintegration into separate fragments occurred starting from the tenth day of storage of the clot in physiological saline. Additionally, the color of the clot changed—from red-yellow to white. This change is explained by the gradual release of blood components from the clot into the physiological solution.

Considering that injectable platelet-rich fibrin (i-PRF) is enriched with platelets, leukocytes, type I collagen, osteocalcin, and growth factors [19], it possesses non-specific antimicrobial properties and may consequently influence the infectious activity of bacteriophages. Vyshnavi B Sindhusa and Jaiganesh Ramamurthy demonstrated that i-PRF exhibits stronger antimicrobial efficacy

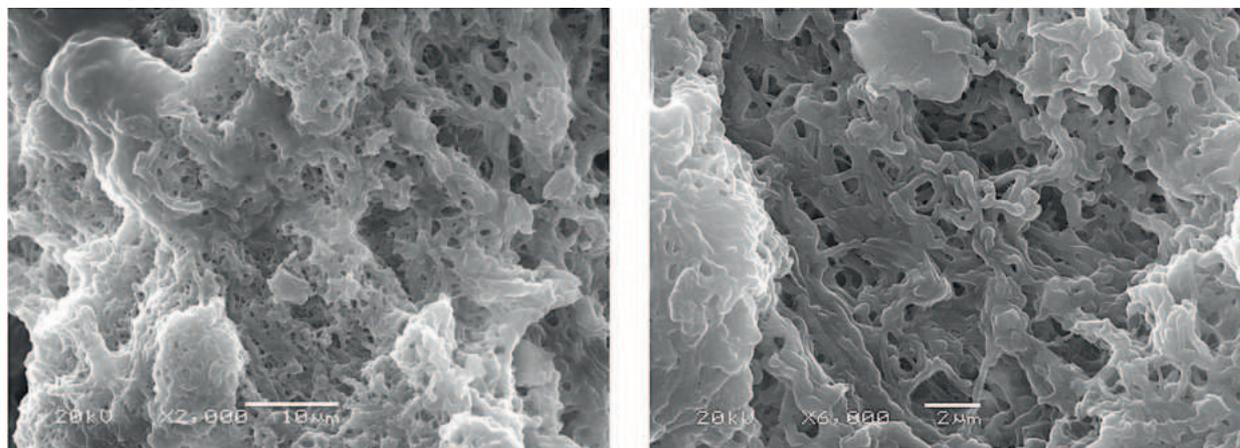


Figure 5 – Structure of autologous fibrin glue with bacteriophages. Scanning electron microscopy.

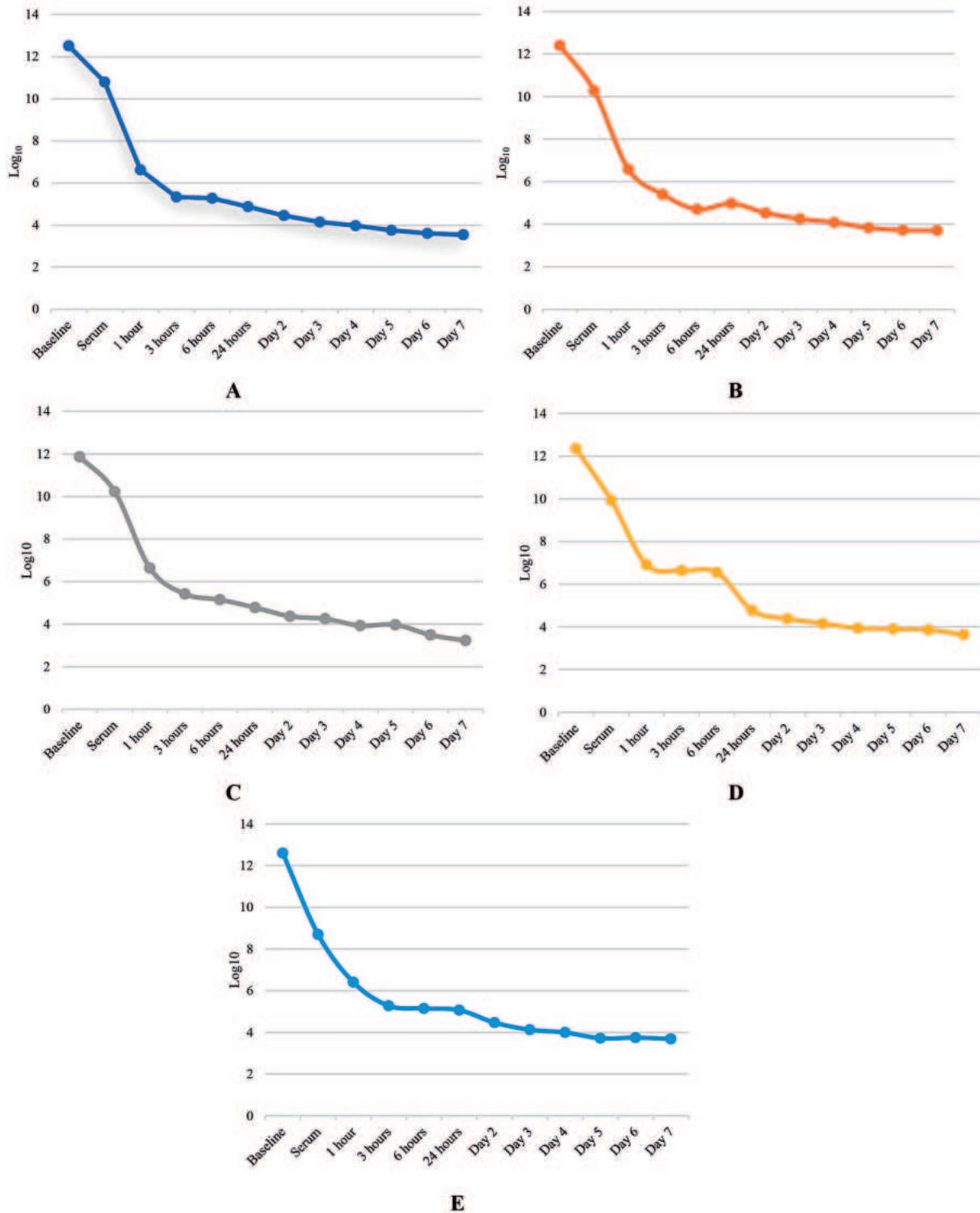


Figure 6 – Dynamics of phage desorption from fibrin glue during a one-week observation period: A – *P. mirabilis* phages; B – *P. vulgaris* phages; C – *S. pyogenes* phages; D – *P. aeruginosa* phages; E – *E. coli* phages.

Notes: Values for each sample are presented as means. The decrease in phage concentration at all time points was statistically significant compared to the initial solution for all phages ($p < 0.05$)

compared to leukocyte-PRF (l-PRF), allowing reduction of microbial load in infected periodontal tissues [29]. Enhanced antimicrobial properties of PRF variants, particularly i-PRF, have also been confirmed in several other studies [30]. Therefore, one of the aims of this study was to evaluate the effect of i-PRF on the viability and stability of various bacteriophage types incorporated into it. Experimental results confirmed good biocompatibility

of the autologous injectable fibrin glue (i-PRF) with different types of bacteriophages (all five bacterial species tested). The phages remained stable within the fibrin glue and retained their infectious activity throughout the observation period.

Since the fibrin matrix gradually degrades over time (typically within 7-11 days), the growth factors and cytokines encapsulated within it are gradually released

into the surrounding tissues [31]. Accordingly, bacteriophages embedded in the fibrin clot matrix are subject to the same release dynamics. The phage release profiles showed two phases: an initial rapid release during the first hours, followed by a gradual decline in release concentration until stabilization at a low level. This biphasic curve is characteristic of prolonged release from gels. It was found that all phage types used in the study were well distributed within the fibrin glue matrix during preparation and were evenly released as the matrix degraded throughout the observation period.

Our findings are consistent with data obtained from studies of the commercial surgical fibrin glue TISSEEL combined with a bacteriophage active against *Pseudomonas aeruginosa* [32].

Injectable fibrin glue is easily prepared by mixing phages with plasma collected during centrifugation and can be dispensed via syringe or sprayed to coat various surfaces (e.g., implanted medical devices, bone tissue, etc.). Application of the prepared injectable fibrin glue directly into wounds or fixation of implants to bone tissue using i-PRF may have promising potential for combating pathogens causing purulent-inflammatory diseases. This is also related to the fact that during *in vivo* use of i-PRF, the serum containing a significant concentration of phages is not removed from the preparation but is delivered together with the fibrin glue into the body.

Thus, injectable fibrin glue with bacteriophages represents a highly promising delivery system for creating a local depot of antibacterial agents. This combination can be used for the prevention and treatment of surgical infections and chronic wounds, including those caused by antibiotic-resistant microbial strains.

Conclusions.

The experimental results obtained open perspectives and emphasize the necessity for further research in this area to expand knowledge and improve potential clinical applications of injectable autologous fibrin glue with bacteriophages. Future studies will focus on the potential use of phage-antibiotic synergy to enhance antibacterial effects and the application of lyophilized bacteriophage formulations to facilitate preparation of i-PRF combined with phages.

Prospects for further research.

Further experimental studies will focus on evaluating the compatibility of phages with antibiotics or other biologically active substances in order to develop combined therapeutic systems aimed at reducing selective pressure and preventing the emergence of secondary resistance. The biocompatibility and anti-inflammatory properties of the i-PRF system combined with bacteriophages will also be investigated *in vivo*, particularly in experimental models of purulent-inflammatory complications.

DOI 10.29254/2077-4214-2025-2-177-401-415

УДК 616-089.843:578.2:616-002-022.7:616.7

¹Понятовський В. А., ²Широбоков В. П., ²Ліненко О. М., ²Лютко О. Б.

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ АВТОЛОГІЧНОГО ФІБРИНОВОГО КЛЕЮ З БАКТЕРІОФАГАМИ В ТРАВМАТОЛОГІЇ ТА ОРТОПЕДІЇ

¹Національний медичний університет імені О.О. Богомольця (м. Київ, Україна)

²ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України» (м. Київ, Україна)

v.poniatovskiy@gmail.com

Ін'єкційний фібриновий клей, збагачений тромбоцитами (i-PRF) – це автологічний концентрат тромбоцитів із фібриновими волокнами, який широко використовується в різних галузях медицини та є цінним допоміжним засобом для регенерації пошкоджених тканин під час хірургічних втручань. Крім того, i-PRF може слугувати засобом для місцевої доставки та депонування антибактеріальних препаратів. Використання бактеріофагів у складі фібринового клею може стати додатковим інструментом у боротьбі з антибіотикорезистентними штамами мікроорганізмів.

Мета дослідження – перевірка біосумісності та стабільності різних типів бактеріофагів, включених до складу полімеризованого i-PRF, дослідження динаміки їх вивільнення з фібринових каркасів, а також визначення інфекційної активності десорбованих бактеріофагів.

За допомогою ультрафільтрації готували фаговий коктейль високої концентрації (не менше ніж 10^{10} БУО/мл) з різних типів бактеріофагів. Ін'єкційний автологічний фібриновий клей полімеризували в присутності отриманого фагового коктейлю, після чого фібринові блоки поміщали у фізіологічний розчин та інкубували при температурі $36 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 7 діб для десорбції бактеріофагів. Через визначені проміжки часу визначали кількість десорбованих бактеріофагів у фізіологічному розчині та оцінювали їх інфекційну активність.

Фібриновий клей, полімеризований у присутності коктейлю бактеріофагів, активних щодо п'яти різних видів бактеріальних збудників, стабільно вивільняв усі типи бактеріофагів протягом 7 діб інкубації в рідкому середовищі при температурі $36 \pm 1^\circ\text{C}$. З використанням методу агарових шарів було встановлено, що десорбовані бактеріофаги спричиняли специфічний лізис усіх п'яти видів мікроорганізмів (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*) протягом усього періоду спостереження.

Отримані результати свідчать про доцільність застосування ін'єкційного автологічного фібринового клею як матриці для тривалої місцевої доставки бактеріофагів. Такий підхід є перспективним для профілактики та лікування інфекційних ускладнень у травматології та ортопедії.

Ключові слова: фібриновий клей, i-PRF (ін'єкційний фібриновий клей, збагачений тромбоцитами), бактеріофаги, місцеве депо антибактеріальних засобів.

Зв'язок роботи з плановими науково-дослідними роботами.

Представлена робота є фрагментом наукових досліджень у межах ініціативної науково-дослідної роботи «Використання бактеріофагів для протидії антибіотикорезистентним варіантам *Klebsiella pneumoniae*», державний реєстраційний номер 0123U100951.

Вступ.

Травматичні відкриті пошкодження кісток людини часто супроводжуються їх інфікуванням, що суттєво ускладнює корекцію кісткових дефектів і відновлення функціональності уражених ділянок. Крім того, однією з актуальних проблем сучасної травматології та ортопедії є розвиток післяопераційних інфекцій, пов'язаних з неповною біосумісністю штучних імплантатів з організмом пацієнта.

Останні публікації вказують на високий рівень інфікування (2,8-40,5 %) при відкритих переломах з множинними кістковими уламками, забрудненням рани, втратою кісткової тканини, значними ушкодженнями м'яких тканин та супутнім судинним ураженням [1]. За даними різних досліджень, частота інфекційних ускладнень після планових оперативних втручань на стопі та гомілковостопному суглобі становить 2,1% [2]. Інфекції місця хірургічного втручання після травматичних ортопедичних операцій у пацієнтів літнього віку відмічаються у 2,7% випадків [3]. При імплантації кульшового та колінного суглобів частота розвитку інфекцій коливається від 0,5% до 4% [4]. Інфекції протезованих суглобів виникають у 0,5-3% випадків серед усіх імплантованих протезів та досягають 20% при ревізійних операціях [5].

З епідеміологічної точки зору, післяопераційні інфекційні ускладнення є важливою проблемою, оскільки частота застосування різноманітних імплантатів продовжує зростати в усіх розвинутих країнах. Щорічно кількість використання імплантатів збільшується приблизно на 5%. Прогнозується, що до кінця 2030 року кількість ревізій кульшового та колінного суглобів зросте на 137% та 601% відповідно. На сьогодні в Європі щорічно проводиться близько 700 000 операцій з імплантації протезів [5, 6].

Проблеми, що виникають через мікроорганізми з різним ступенем антибіотикорезистентності та обмеження щодо системної доставки антибіотиків, включаючи субтерапевтичні концентрації препаратів у цільових зонах через порушення васкуляризації та погану перфузію, можуть призвести до неефективності хірургічного лікування опорно-рухового апарату. Тому в останні роки активно розробляються ефективні стратегії місцевої доставки протимікробних засобів у вогнища запалення з метою лікування та профілактики інфекцій у ділянках хірургічного втручання. Розробка та дослідження носіїв для створення місцевих депо з пролонгованим вивільненням лікарських засобів можуть знизити побічні ефекти, підвищити ефективність лікування та відкрити нові можливості для терапії інфекційних ускладнень.

На сьогодні активно вивчаються та застосовуються різноманітні природні та синтетичні матеріали для місцевої доставки антибіотиків. Зокрема, на практиці найчастіше використовуються кісткові цементи з антибіотиками (antibiotic-loaded bone cements, ALBC) [7], колагенові губки (фліси), просочені антибіотика-

ми [8], поліметилметакрилатні матеріали (PMMA) [9], біорозсмоктувані ін'єкційні гідрогелі з антибіотиками [10], тощо. Вивільнення антибактеріальних засобів із матриці може відбуватися за різними механізмами: дифузією з матриці, що залишається неушкодженою, одночасним вивільненням препарату та деградацією матриці або витісненням препарату осмотичним тиском.

Перспективним також є використання PRF для місцевої доставки антимікробних засобів. Збагачений тромбоцитами фібрин (Platelet-Rich Fibrin, PRF) – це аутологічний фібриновий клей, виготовлений з крові пацієнтів, який, окрім інтраопераційного застосування, також застосовується для лікування інфікованих ран. Складаючись із фібринової матриці, що містить високі концентрації тромбоцитарних факторів росту, хемокінів та лейкоцитів, PRF здатен покращувати загоєння ран і забезпечувати місцевий антимікробний захист [11]. Поєднання PRF з антибіотиками забезпечує пролонгований антибактеріальний ефект цього матеріалу [12]. Було продемонстровано, що концентрації тромбоцитів PRF вивільняють кілька факторів росту, таких як тромбоцитарний фактор росту (PDGF), трансформуючий фактор росту (TGF) і васкулярний ендотеліальний фактор росту (VEGF). Вивільнення факторів росту відбувається поступово протягом 10 днів у місці імплантації. Збільшуючи локальну концентрацію факторів росту в певних тканинах, PRF сприяє регенерації тканин [13]. PRF часто використовується в поєднанні з матеріалами для кісткових трансплантатів для скорочення часу загоєння та сприяння регенерації кістки. Завдяки своїм біологічним властивостям PRF застосовується в реставраційній стоматології, ортопедії, щелепно-лицевій та пластичній хірургії, при лікуванні глибоких інфекцій ділянки хірургічного втручання, а також для лікування стійких діабетичних виразок [11, 14, 15, 16].

I-PRF (Injectable Platelet-Rich Fibrin) – це новітня розробка в родині PRF, яка має додаткову перевагу у вигляді рідкої консистенції протягом 10-15 хвилин після центрифугування та повільно полімеризується, утворюючи фібриновий згусток [17]. Оскільки i-PRF є аутогенним матеріалом, його використання зменшує ймовірність побічних реакцій на імплантований матеріал. Можливість зв'язування i-PRF з біоматеріалами для кісткової пластики відкриває альтернативу PRP (platelet-rich plasma) як тромбоцитарного агрегату для регенерації кісткової тканини [18]. Процедура i-PRF включає забір невеликої кількості крові у пацієнта, подібно до звичайного забору крові для аналізів. Зібрана кров обробляється за допомогою спеціального центрифугування, що дозволяє відокремити компоненти крові, включаючи плазму з тромбоцитами та фібринові волокна. Отримана суміш, що містить i-PRF, застосовується безпосередньо на область, яка потребує регенерації. У випадку обширних кісткових дефектів обробка кісткових трансплантатів для нарощування кісткової тканини є значною проблемою. Використання i-PRF, змішаного з біоматеріалом трансплантата, стає ефективною стратегією для подолання таких перешкод [19].

Іншою проблемою, що стосується розвитку післяопераційних інфекційних ускладнень, є зростаюча тенденція появи та поширення антибіотикорезистентності у клінічно значущих мікроорганізмах при

низьких темпах розробки нових протимікробних препаратів. Так, у США щороку реєструється понад 2,8 мільйона інфекцій, що пов'язані з мікроорганізмами, які стійкі до антимікробних препаратів. Згідно зі звітом CDC за 2019 рік, на території США щорічно фіксується понад 35 000 смертей, спричинених антибіотикорезистентними мікроорганізмами [20]. Таким чином, для подолання резистентності до антибіотиків і підвищення ефективності лікування інфекцій, що ними спричиняються, необхідні нові стратегії антимікробної терапії.

Допоміжним елементом у боротьбі з антибіотикорезистентними штамми мікроорганізмів (MDR, XDR та PDR), на який останнім часом звертають усе більше уваги, можуть стати бактеріофаги. Фаги (або бактеріофаги) – це природні віруси, які можуть специфічно націлюватися на бактерії та вбивати їх, не впливаючи на ріст і розмноження нормофлори організму людини. Ряд наукових досліджень, проведених в умовах *in vitro* та *in vivo*, вказують на високу ефективність бактеріофагів щодо антибіотикорезистентних мікроорганізмів [21, 22, 23]. Фагові коктейлі також знайшли застосування при інфекційних ускладненнях в ортопедії та травматології [24, 25].

Мета дослідження.

Дослідити можливість використання автологічного фібринового клею i-PRF у комбінації з полівалентним бактеріофаговим препаратом для місцевої доставки та створення депо антимікробних засобів.

Об'єкт і методи дослідження.

Приготування фагів. Для приготування фагового коктейлю використовувалися бактеріофаги з колекції кафедри мікробіології, паразитології з основами імунології НМУ імені О.О. Богомольця. Фаги були виділені з об'єктів зовнішнього середовища за загальноприйнятими методами [26]. Коктейль, що був використаний у дослідженні, складався з фагів, що активні у відношенні наступних мікроорганізмів: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*. Спектр обраних бактеріофагів ґрунтувався на тому, що фаги, активні у відношенні вище зазначених мікроорганізмів, входять до складу комбінованого комерційного препарату «Піофаг», який використовується для лікування бактеріальних інфекцій в країнах Східної Європи. В Україні даний препарат відноситься до лікарських засобів, та дозволений до використання в медичній практиці.

Для отримання окремих компонентів коктейлю вносили свіжу нічну бульйонну культуру відповідних бактерій та маточні розчини бактеріофагів у колби Ерленмейера об'ємом 250 мл, що містили 200 мл поживного бульйону для культивування мікроорганізму (виробництво HIMEDIA®). Після цього суміші інкубували при температурі 37°C протягом 18-24 годин. Після завершення інкубації рештки бактерій видаляли фільтрацією через шприцевий фільтр 0,22 мкм Millex® (Merck Millipore, Німеччина), а фагові монокомпоненти змішували разом для отримання коктейлю.

З метою отримання високої концентрації фагів у фібринових блоках фаговий коктейль додатково піддавали ультрафільтрації

(Sartoflow® Smart, з молекулярною масою відсічення 100 кДа) для досягнення титру не менше ніж 10¹⁰ БУО/мл кожного із фагів.

Визначення титру фагів. Для точного встановлення концентрації бактеріофагів у розчинах застосовували класичний метод Грація, який дозволяє проводити кількісний підрахунок фагових часток. Середовищем для титрування слугував поживний агар для культивування мікроорганізмів (виробництво HIMEDIA®). Титр бактеріофагів виражали в БУО/мл. Для зручності подання результатів отримані дані додатково конвертували у логарифмічну форму (Log₁₀).

Тест-культури. В якості індикаторних бактерій були використані 5 культур бактерій, що отримані з української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології, вірусології та імунології імені Д.К. Заболотного НАН України – *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Proteus mirabilis* (B-7500), *Proteus vulgaris* (B-7501), *Pseudomonas aeruginosa* (B-7505), *Streptococcus pyogenes* (B-7507). Для культивування бактерій був використаний триптоно-соевий агар та бульйон (виробництво Merck).

Скануюча електронна мікроскопія. Проведена на базі Центру колективного користування електронними мікроскопами НАН України (ЦККЕМ) Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України. В досліді була використана скануюча електронна мікроскопія (растровий електронний мікроскоп JSM-6060 LA (фірма JEOL, Японія). Для фіксації зразка використаний розчин глутарового альдегіду 2,5%. Напилення здійснювали золотом із застосуванням приладу для нанесення тонкого шару золота катодним методом – JFC-1600.

Просвічуюча електронна мікроскопія. Для приготування плівок-підложок на опорних сітках використовували формвар. Досліджувані зразки піддавалися контрастуванню 2% фосфорно-вольфрамовою кислотою (рН 6,8). Час експозиції контрастеру 1-2 хв. Досліджувані зразки із бактеріофагами наносили на плівку-підложку крапельним способом. Опорні сітки застосовувалися з характеристикою 230 mesh. Приготовлені препарати досліджували з використанням трансмісійного електронного мікроскопа JEM 1230.

Отримання автологічного фібринового клею. Для приготування i-PRF відбирали 10 мл цільної крові без антикоагулянту в пробірку та центрифугували при 700 об/хв протягом 3 хвилин за кімнатної температури. За цей час еритроцити частково осідали на дно, тоді як плазма у верхній частині пробірки залишалася рідкою й не встигала загуснути. Верхній шар отриманої рідини збирали для подальшого використання як i-PRF [27].

Після відділення плазми від формених елементів її змішували за допомогою шприца з бактеріофагами у співвідношенні 0,5 мл фагового концентрату до 2,5



Рисунок 1 – Формування фібринового каркасу.

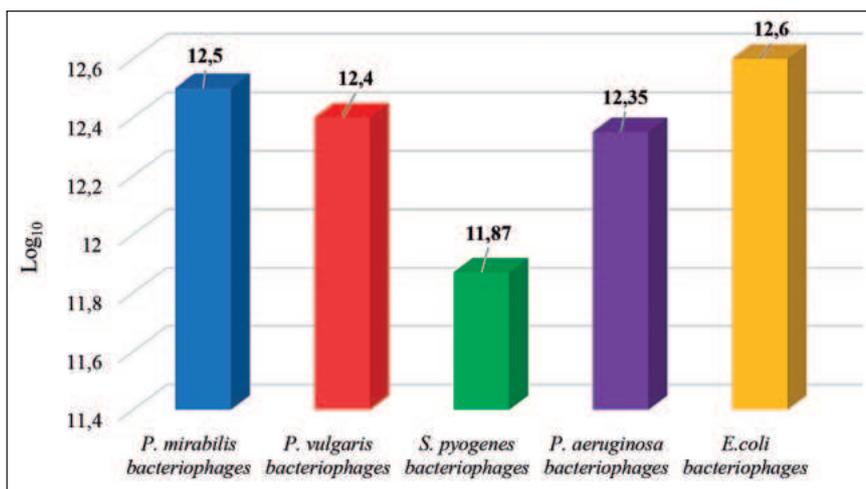


Рисунок 2 – Вміст різних бактеріофагів у концентрованому фаговому коктейлю після ультрафільтрації.

мл плазми крові та залишали за кімнатної температури для формування фібринового згустку (рис. 1).

По закінченню формування згустку проводили його розділення на сироватку та власне фібриновий каркас.

Десорбція фагів. Для дослідження процесу десорбції фагів фібриновий каркас занурювали у 3 мл фізіологічного розчину та інкубували його за температури 36 ± 1 °C протягом 7 діб. Через визначені проміжки часу (1, 2, 3, 6, 24 години, а також на 2, 3, 4, 5, 6 та 7 добу) здійснювали заміну супернатанту, видаляючи попередній розчин з десорбованими фагами і додаючи свіжий фізіологічний розчин. Концентрацію бактеріофагів визначали в кожному з елюентів. Окрім цього, протягом усього експериментального періоду проводили візуальну оцінку стану фібринових блоків.

Результати дослідження та їх обговорення.

При визначенні титру бактеріофагів в отриманих фаголізатах було встановлено, що їх концентрація становила від 10^5 до 10^7 БУО/мл залежно від типу

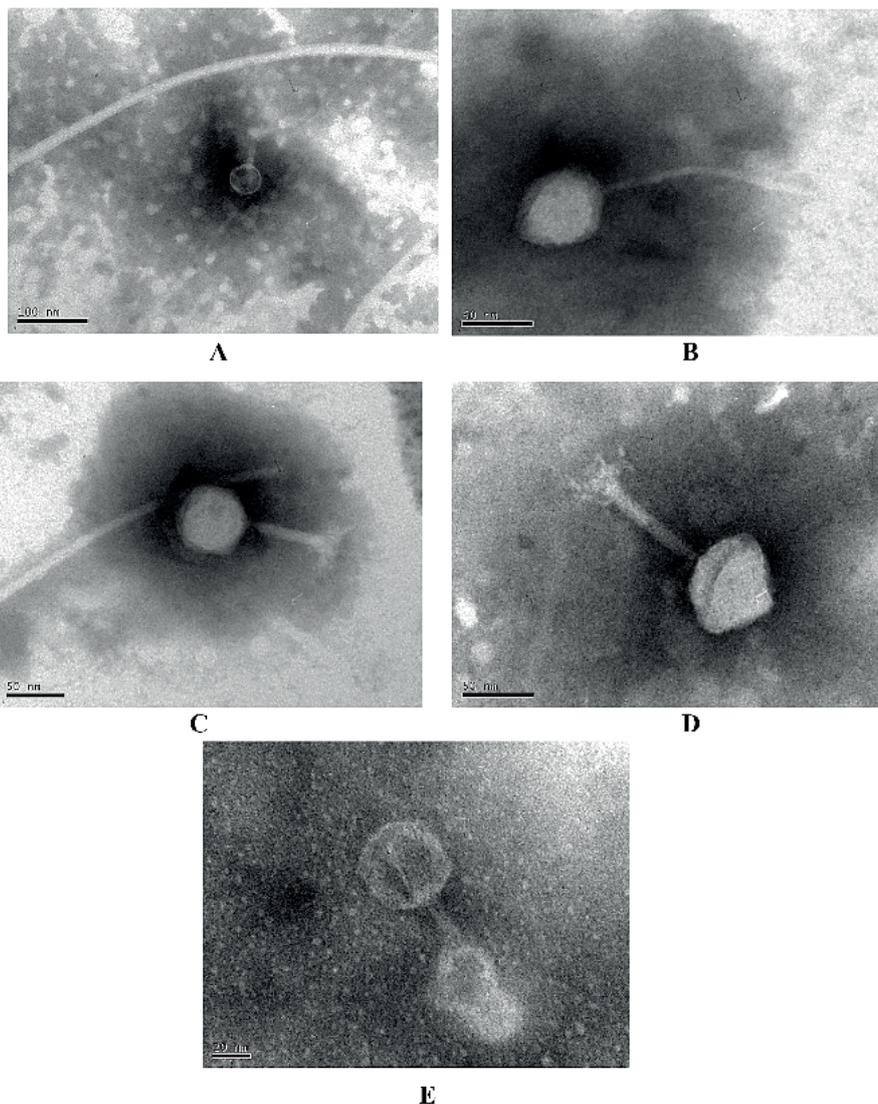


Рисунок 3 – Просвічуюча електронна мікроскопія отриманого фагового концентрату: А, С, D, E - Myo-like morphotype, B – Siph-like morphotype.

бактеріофага. Тому на першому етапі дослідження проводили концентрування фаголізатів з метою підвищення їх титру до рівня не менше ніж 10^{10} БУО/мл для кожного з бактеріофагів, використаних у дослідженні. Така концентрація фагів є необхідною для забезпечення високої їх кумуляції у вогнищі запалення та, відповідно, підвищення ефективності, що відповідає сучасним підходам до фаготерапії. Експериментально було підтверджено, що застосування високих доз фагів при ранових інфекціях знижує бактеріальне навантаження значно ефективніше, ніж використання низьких доз, а повторне введення фагів дозволяє досягти максимальних показників ерадикації збудника [28].

Після закінчення етапу ультрафільтрації препарату проводили визначення його активності з використанням методу Грація. Було підтверджено, що застосування фільтраційних пластин з молекулярною масою відсічення 100 kDa дозволяє отримати фаговий препарат високої концентрації (рис. 2).

Використання просвічуючої електронної мікроскопії отриманого концентрату також підтвердило наявність в препараті фагів різних морфологічних груп (рис. 3).

Після контролю якості приготовленого концентрату проводили змішування фагового концентрату з плазмою крові у співвідношенні 0,5:2,5. Отриману суміш залишали при кімнатній температурі для формування фібринового конгломерату. Уже через сорок хвилин спостерігалось просвітлення плазми та чітке формування згустку. Після завершення формування фібринового каркасу згусток відокремлювали від сироватки та піддавали подальшому дослідженню.

Визначення концентрації фагів у сироватці показало, що в ній міститься досить велика кількість бактеріофагів, що володіють інфекційною активністю (з 8,7 до 11,93 \log_{10} в залежності від бактеріофагу). Це вказує на те, що значна частина вірусних часток не сорбуються на фібринових волокнах автологічного фібринового клею (рис. 4).

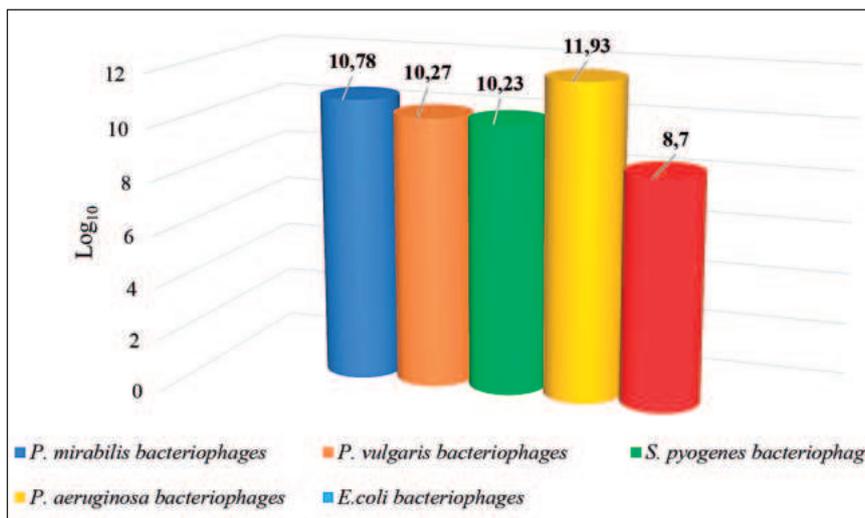


Рисунок 4 – Вміст бактеріофагів у сироватці після формування фібринового каркасу (титр фага виражений у \log_{10} БУО/мл).

Скануюча електронна мікроскопія показала, що внутрішня структура автологічного фібринового клею з бактеріофагами мала губчасто-волокнисту структуру з добре помітними фібриновими волокнами (рис. 5).

Для дослідження можливості використання автологічного фібринового клею в якості місцевого депо бактеріофагів сформовані фібринові каркаси поміщали у фізіологічний розчин (0,9% NaCl) та інкубували при температурі $36 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом тижня, періодично змінюючи фізіологічний розчин, в якому знаходився згусток, через певні проміжки часу. Вибір терміну спостереження ґрунтувався на тому, що бактеріофаги є антигенними компонентами для людського організму, і у відповідь на їх потрапляння виробляються антифагові антитіла, які в кінцевому результаті нейтралізують фаги.

Результати експериментального дослідження свідчать про ефективне захоплення бактеріофагів фібриновою матрицею з поступовим їх вивільненням у фізіологічний розчин. Криві вивільнення демонструють раптовий вихід фагів на початку (стрімке зниження титру в каркасі) з подальшим уповільненням зміни. Вже через годину після занурення фібринових клейових блоків у фізіологічний розчин значна частина бактеріофагів перейшла із згустку до фізіологічного розчину, що може вказува-

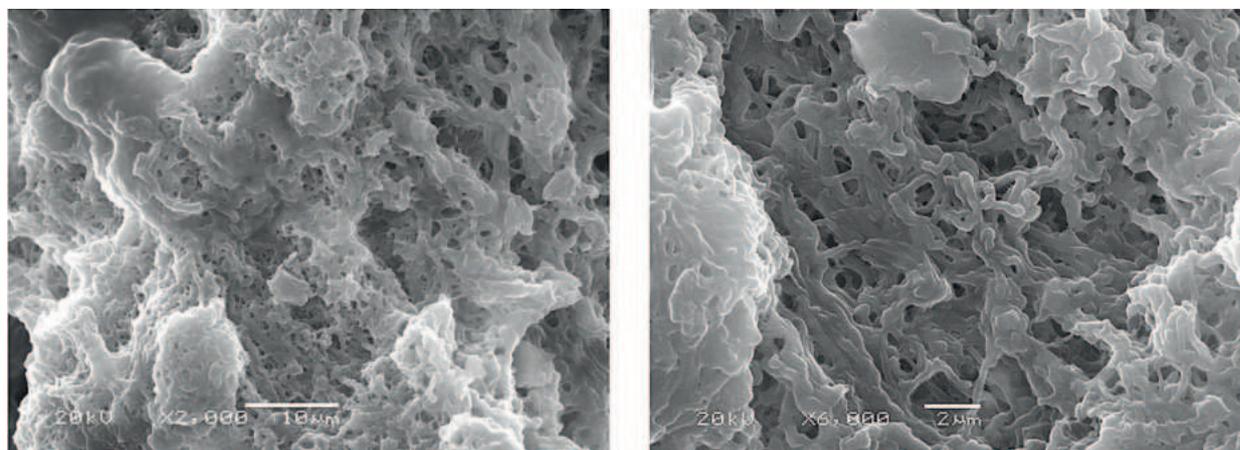


Рисунок 5 – Структура автологічного фібринового клею з бактеріофагами. Скануюча електронна мікроскопія.

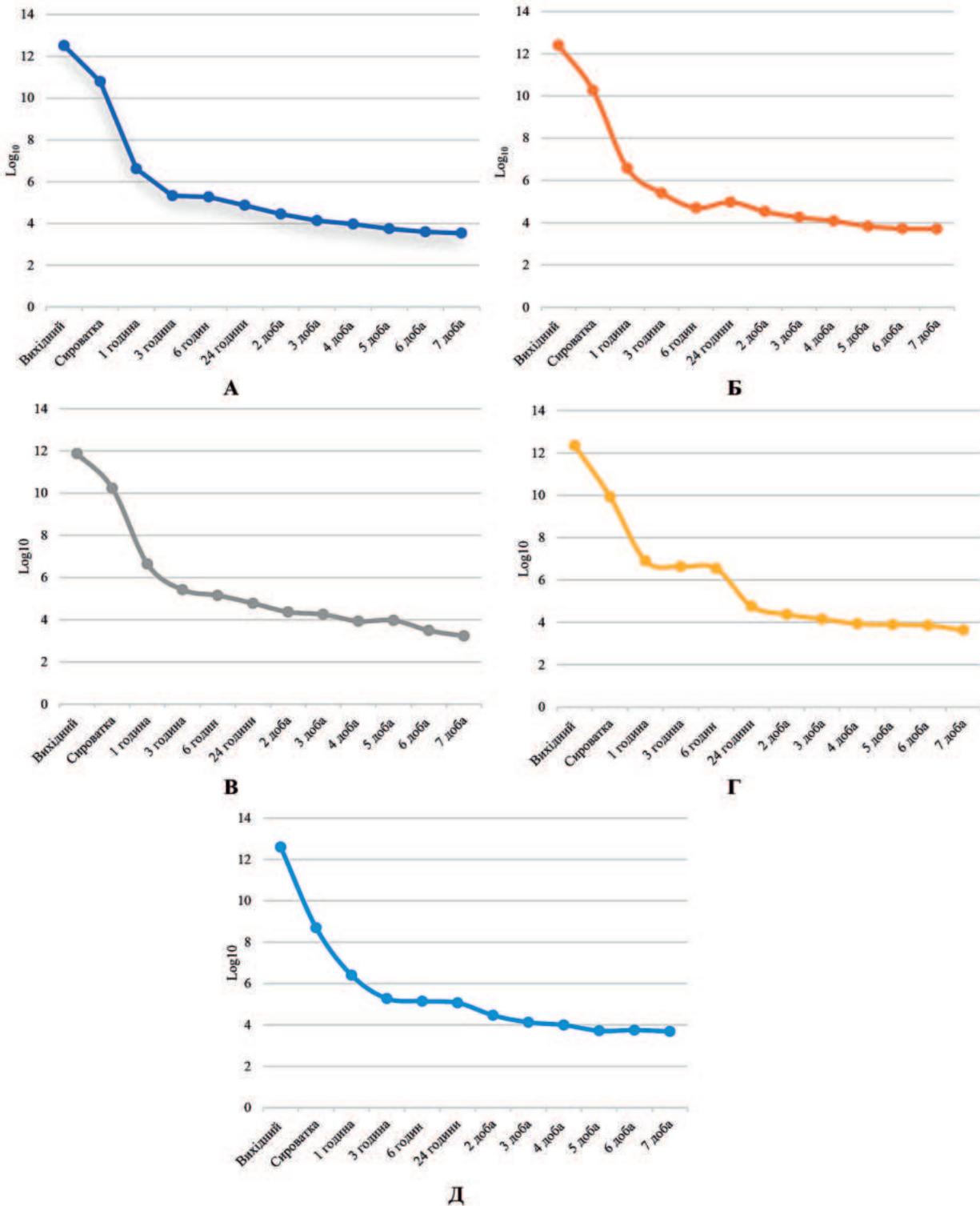


Рисунок 6 – Динаміка десорбції фагів з фібринового клею за тижневий період спостереження.: А. – фаги *P. mirabilis*; Б. – фаги *P. vulgaris*; В. – фаги *S. pyogenes*; Г. – фаги *P. aeruginosa*; Д. – фаги *E. coli*.

Примітки: Значення для кожного зразка наведені як середнє. Зниження концентрації фагів на всіх етапах дослідження статистично значиме в порівнянні із вихідним розчином для всіх фагів ($p < 0.05$).

ти на присутність фагів у значній кількості в зовнішньому шарі фібринового каркасу. Через 3 та 6 годин інкубації кількість вивільнених фагів була приблизно в десять раз менша в порівнянні з першою годинною (рис. 6).

Найвища швидкість десорбції в перші години може бути пов'язана з вивільненням фагів із поверхневих шарів фібринового каркасу, тоді як повільніше

вивільнення на пізніх етапах відображає дифузію фагів із глибших шарів. Різниця в концентраціях між типами фагів може бути зумовлена їхньою різною афінністю до фібринової матриці або розмірами віріонів, що впливають на швидкість дифузії.

Від першої до сьомої доби спостереження відбувався поступовий розпад фібринового каркасу з вивільненням фагів, концентрація яких постійно зни-

жувалася. Після сьомої доби в розчині для десорбції рееструвалися значні титри фагів (10^2 БУО/мл), що є основою для твердження про перспективність використання фібринового клею з бактеріофагами для практичного використання. Ця тенденція вивільнення була характерною для всіх п'яти типів фагів, які застосовувалися в дослідженні.

Під час візуального спостереження за фібриновим згустком протягом періоду дослідження відмічалось, що він поступово зменшувався в розмірі. Повний розпад на окремі фрагменти відбувався, починаючи з десятої доби зберігання згустку у фізіологічному розчині. Крім того, змінювався також його колір – від червоно-жовтого до білого. Це пояснюється поступовим виходом компонентів крові зі згустку у фізіологічний розчин.

Зважаючи на те, що ін'єкційний фібрин (i-PRF) насичений тромбоцитами, лейкоцитами, колагеном I типу, остеокальцином і факторами росту [19], він має неспецифічну антимікробну властивість, та відповідно може впливати на інфекційні активність бактеріофагів. Так, Vyshnavi B Sindhusa та Jaiganesh Ramamurthy продемонстрували, що i-PRF має вираженішу антимікробну ефективність в порівнянні з I-PRF, що дозволяє зменшувати мікробне навантаження в ділянці інфікованого пародонту [29]. Покращені антимікробні властивості у варіаціях PRF, зокрема у i-PRF, також було показано в ряді інших досліджень [30]. Саме тому, одним із завдань дослідження стала перевірка впливу i-PRF на життєздатність та стабільність різних типів бактеріофагів, які були до нього включені. Експериментальні дослідження підтвердили хорошу біосумісність у аутологічному ін'єкційному фібриновому клеї (i-PRF) з різними типами бактеріофагів (до всіх 5 видів бактерій). Фаги залишалися стабільними в складі фібринового клею та проявляли свою інфекційну активність протягом усього періоду спостереження.

Оскільки фібринова матриця поступово розпадається з часом (зазвичай протягом 7-11 днів), інкапсульовані в ній фактори росту та цитокіни поступово вивільняються в навколишні тканини [31]. Відповідно бактеріофаги, що були вбудовані у каркас фібринового згустка, також піддаються цим закономірностям. На графіках вивільнення бактеріофагів можна відзначити два етапи: швидке вивільнення протягом перших годин і плавне зниження концентрації вивільнення до стабілізації на низькому рівні. Така двофазна крива характерна для пролонгованого вивільнення із гелю. Було встановлено, що усі типи фагів, які використані у досліді, добре розподіляються в каркасі фібринового клею під час його приготування та рівномірно виді-

лялися при розпаді матриці протягом усього періоду спостереження.

Отримані нами результати співставні з даними, що були одержані при дослідженні комерційного фібринового клею для хірургічних цілей TISSEEL з бактеріофагом, що активний у відношенні *P. aeruginosa* [32].

Ін'єкційний фібриновий клей легко приготувати шляхом змішування фагів із зібраною під час центрифугування плазмою крові, і її можна видавити зі шприца або розпилити для покриття різних поверхонь (наприклад, імплантованих медичних пристроїв, кісткової тканини тощо). Введення приготовленого ін'єкційного фібринового клею безпосередньо в рану, чи фіксація імплантів до кісткової тканини за допомогою i-PRF може мати хороші перспективи в плані боротьби із збудниками гнійно-запальних хвороб. Це пов'язано також і з тим, що при застосуванні i-PRF в умовах *in vivo*, сироватка, яка містить досить значну концентрацію фагів не видаляється з препарату, а разом із фібриновими клеєм вноситься в організм.

Таким чином, ін'єкційний фібриновий клей з бактеріофагами є багатообіцяючою системою для доставки та створення місцевого депо антибактеріальних засобів. Дану комбінацію можна використовувати для профілактики та лікування хірургічних інфекцій та хронічних ран, в тому числі тих, що спричинені антибіотикорезистентними штамми мікроорганізмів.

Висновки.

Отримані експериментальні результати відкривають перспективи та необхідність подальших досліджень у цьому напрямі з метою розширення знань та вдосконалення можливого клінічного застосування ін'єкційного аутологічного фібринового клею з бактеріофагами. Майбутні дослідження будуть зосереджені на можливості використання фагово-антибіотикового синергізму для підвищення антибактеріального ефекту та застосування ліофілізованих форм бактеріофагів для полегшення приготування i-PRF в комбінації із фагами.

Перспективи подальших досліджень.

Подальші експериментальні дослідження будуть спрямовані на оцінку сумісності фагів з антибіотиками або іншими біологічно активними речовинами з метою створення комбінованих терапевтичних систем, спрямованих на зниження селекційного тиску та профілактику виникнення вторинної резистентності. Також буде вивчено біосумісність та протизапальні властивості системи i-PRF з бактеріофагами в умовах *in vivo*, зокрема на експериментальних моделях гнійно-запальних ускладнень.

References / Література

- Coombs J, Billow D, Cereijo C, Patterson B, Pinney S. Current concept review: Risk factors for infection following open fractures. *Orthopedic Research and Reviews*. 2022;14:383-91. DOI: [10.2147/orr.s384845](https://doi.org/10.2147/orr.s384845).
- Meng J, Zhu Y, Li Y, Sun T, Zhang F, Qin S, et al. Incidence and risk factors for surgical site infection following elective foot and ankle surgery: A retrospective study. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2020;15(1):449. DOI: [10.1186/s13018-020-01972-4](https://doi.org/10.1186/s13018-020-01972-4).
- Le J, Dong Z, Liang J, Zhang K, Li Y, Cheng M, et al. Retracted: Surgical site infection following traumatic orthopaedic surgeries in geriatric patients: Incidence and prognostic risk factors. *International Wound Journal*. 2019;17(1):206-13. DOI: [10.1111/iwj.13258](https://doi.org/10.1111/iwj.13258).
- Kennedy DG, O'Mahony AM, Culligan EP, O'Driscoll CM, Ryan KB. Strategies to mitigate and treat orthopaedic device-associated infections. *Antibiotics*. 2022;11(12):1822. DOI: [10.3390/antibiotics11121822](https://doi.org/10.3390/antibiotics11121822).
- Basile G, Gallina M, Passeri A, Gaudio RM, Castelnuovo N, Ferrante P, et al. Prosthetic joint infections and legal disputes: A threat to the future of Prosthetic Orthopedics. *Journal of Orthopaedics and Traumatology*. 2021;22(1):44. DOI: [10.1186/s10195-021-00607-6](https://doi.org/10.1186/s10195-021-00607-6).
- Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030 *J Bone Joint Surg Am*. 2007;89(4):780-5. DOI: [10.2106/jbjs.f.00222](https://doi.org/10.2106/jbjs.f.00222).

- Chen AF, Parvizi J. Antibiotic-loaded bone cement and periprosthetic joint infection. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*. 2014;24(2-3):89-97. DOI: [10.1615/jlongtermeffmedimplants.2013010238](https://doi.org/10.1615/jlongtermeffmedimplants.2013010238).
- Van Vugt TAG, Walraven JMB, Geurts JAP, Arts JJC. Antibiotic-loaded collagen sponges in clinical treatment of chronic osteomyelitis. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 2018;100(24):2153-61. DOI: [10.2106/jbjs.17.01140](https://doi.org/10.2106/jbjs.17.01140).
- Johnstone T, Lipman K, Makarewicz N, Shah J, Turner E, Posternak V, et al. Use of antibiotic-impregnated polymethylmethacrylate (PMMA) plates for prevention of periprosthetic infection in breast reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery – Global Open*. 2023;11(1):e4764. DOI: [10.1097/gox.00000000000004764](https://doi.org/10.1097/gox.00000000000004764).
- Boot W, Foster AL, Guillaume O, Eglin D, Schmid T, D'Este M, et al. An antibiotic-loaded hydrogel demonstrates efficacy as prophylaxis and treatment in a large animal model of orthopaedic device-related infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022;12:826392. DOI: [10.3389/fcimb.2022.826392](https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.826392).
- Knafl D, Thalhammer F, Vossen MG. In-vitro release pharmacokinetics of amikacin, Teicoplanin and polyhexanide in a platelet rich fibrin – layer (PRF) – a laboratory evaluation of a modern, autologous wound treatment. *PLOS ONE*. 2017;12(7):e0181090. DOI: [10.1371/journal.pone.0181090](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181090).
- Bennardo F, Gallelli L, Palleria C, Colosimo M, Fortunato L, De Sarro G, et al. Can platelet-rich fibrin act as a natural carrier for antibiotics delivery? A proof-of-concept study for oral surgical procedures. *BMC Oral Health*. 2023;23(1):134. DOI: [10.1186/s12903-023-02814-5](https://doi.org/10.1186/s12903-023-02814-5).
- Shah R, Thomas R, Gowda TM, Baron TK, Vemanaradhya GG, Bhagat S. In vitro evaluation of osteoblast response to the effect of injectable platelet-rich fibrin coating on titanium disks. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. 2021;22(2):107-10. DOI: [10.5005/jp-journals-10024-3039](https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-3039).
- Vasilikos I, Roelz R, Scholz C, Mizaikoff B, Argiti K, Ralf W, et al. Autologous platelet-rich fibrin (PRF) augmentation as an add-on therapy in deep surgical site infections (dssis) after instrumented spinal surgery: Preliminary results of a single institution case series. *Acta Neurochirurgica*. 2021;163(10):2761-7. DOI: [10.1007/s00701-021-04952-7](https://doi.org/10.1007/s00701-021-04952-7).
- Alzahrani AA, Murrity A, Shafik S. Influence of platelet rich fibrin on post-extraction socket healing: A clinical and radiographic study. *The Saudi Dental Journal*. 2017;29(4):149-55. DOI: [10.1016/j.sdentj.2017.07.003](https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2017.07.003).
- Greco AF, Reclaru L, Ardelean LC, Nica O, Ciucă EM, Ciurea ME. Platelet-rich fibrin and its emerging therapeutic benefits for musculoskeletal injury treatment. *Medicina*. 2019;55(5):141. DOI: [10.3390/medicina55050141](https://doi.org/10.3390/medicina55050141).
- Pall E, Roman A, Olah D, Beteg FI, Cenariu M, Spînu M. Enhanced bioactive potential of functionalized injectable platelet-rich plasma. *Molecules*. 2023;28(4):1943. DOI: [10.3390/molecules28041943](https://doi.org/10.3390/molecules28041943).
- Mourão CF, Valiense H, Melo ER, Mourão NB, Maia MD-C. Obtention of injectable platelets rich-fibrin (I-PRF) and its polymerization with Bone Graft: Technical note. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 2015;42(6):421-3. DOI: [10.1590/0100-69912015006013](https://doi.org/10.1590/0100-69912015006013).
- Varela HA, Souza JC, Nascimento RM, Araújo RF, Vasconcelos RC, Cavalcante RS, et al. Injectable platelet rich fibrin: Cell content, morphological, and protein characterization. *Clinical Oral Investigations*. 2018;23(3):1309-18. DOI: [10.1007/s00784-018-2555-2](https://doi.org/10.1007/s00784-018-2555-2).
- Department of Health and Human Services. *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019*. Atlanta: Department of Health and Human Services; CDC; 2019. 150 p.
- Eskenazi A, Lood C, Wubbolts J, Hites M, Balarjishvili N, Leshkasheli L, et al. Combination of pre-adapted bacteriophage therapy and antibiotics for treatment of fracture-related infection due to pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Commun*. 2022;13(1):302. DOI: [10.1038/s41467-021-27656-z](https://doi.org/10.1038/s41467-021-27656-z).
- Chan BK, Turner PE, Kim S, Mojibian HR, Eleftheriades JA, Narayan D. Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Evolution, Medicine, and Public Health*. 2018;2018(1):60-6. DOI: [10.1093/emph/eoy005](https://doi.org/10.1093/emph/eoy005).
- Pallavali RR, Degati VL, Lomada D, Reddy MC, Durbaka VR. Isolation and in vitro evaluation of bacteriophages against MDR-bacterial isolates from septic wound infections. *PLOS ONE*. 2017;12(7):e0179245. DOI: [10.1371/journal.pone.0179245](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179245).
- Onsea J, Wagemans J, Pimay J, Di Luca M, Gonzalez-Moreno M, Lavigne R, et al. Bacteriophage therapy as a treatment strategy for orthopaedic-device-related infections: Where do we stand? *European Cells and Materials*. 2020;39:193-210. DOI: [10.22203/ecm.v039a13](https://doi.org/10.22203/ecm.v039a13).
- Taati Moghadam M, Khoshbayan A, Cheghini Z, Farahani I, Shariati A. Bacteriophages, a new therapeutic solution for inhibiting multidrug-resistant bacteria causing wound infection: Lesson from animal models and clinical trials. *Drug Design, Development and Therapy*. 2020;14:1867-83. DOI: [10.2147/dddt.s251171](https://doi.org/10.2147/dddt.s251171).
- Kutter E, Sulakvelidze A. *Bacteriophages: Biology and applications*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2005. 510 p.
- Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Ghanaati S, et al. Injectable platelet rich fibrin (I-PRF): Opportunities in regenerative dentistry? *Clinical Oral Investigations*. 2017;21(8):2619-27. DOI: [10.1007/s00784-017-2063-9](https://doi.org/10.1007/s00784-017-2063-9).
- Lin Y-H, Dharmaraj T, Chen Q, Echterhof A, Manasherob R, Zhang LJ, et al. Dosing and delivery of bacteriophage therapy in a murine wound infection model. *BioRxiv*. 2024. DOI: [10.1101/2024.05.07.593005](https://doi.org/10.1101/2024.05.07.593005).
- Sindhusha VB, Ramamurthy J. Comparison of antimicrobial activity of injectable platelet-rich fibrin (I-PRF) and leukocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF) against oral microbes: An in vitro study. *Cureus*. 2023;15(9):e46196. DOI: [10.7759/cureus.46196](https://doi.org/10.7759/cureus.46196).
- Moraschini V, Miron RJ, Mourão CF, Louro RS, Sculean A, da Fonseca LA, et al. Antimicrobial effect of platelet-rich fibrin: A systematic review of in vitro evidence-based studies. *Periodontology*. 2020;2023;94(1):131-42. DOI: [10.1111/prd.12529](https://doi.org/10.1111/prd.12529).
- Dohan Ehrenfest DM, de Peppo GM, Doglioli P, Sammartino G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in chondrocyte's platelet-rich fibrin (PRF): A gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors*. 2009;27(1):63-9. DOI: [10.1080/08977190.802636713](https://doi.org/10.1080/08977190.802636713).
- Rubalskii E, Ruemke S, Salmoukas C, Aleshkin A, Bochkareva S, Modin E, et al. Fibrin Glue as a local drug-delivery system for bacteriophage PA5. *Scientific Reports*. 2019;9(1):2091. DOI: [10.1038/s41598-018-38318-4](https://doi.org/10.1038/s41598-018-38318-4).

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ АВТОЛОГІЧНОГО ФІБРИНОВОГО КЛЕЮ З БАКТЕРІОФАГАМИ В ТРАВМАТОЛОГІЇ ТА ОРТОПЕДІЇ

Понятовський В. А., Ширококов В. П., Ліненко О. М., Лютко О. Б.

Резюме. Ін'єкційний фібриновий клей, збагачений тромбоцитами (i-PRF) широко застосовується в різних галузях медицини завдяки своїм регенеративним властивостям. Останнім часом значну увагу привертає його потенціал як носія для локальної доставки біологічно активних речовин. Зокрема, включення бактеріофагів – вірусів, які специфічно лізують бактерії, включаючи полірезистентні штами – до складу i-PRF є новою стратегією боротьби з інфекціями, спричиненими антибіотикорезистентними мікроорганізмами.

Метою цього дослідження було оцінити сумісність і стабільність різних типів бактеріофагів, включених до полімеризованого i-PRF, вивчити динаміку їх вивільнення з фібринових матриць та визначити літичну активність десорбованих фагів. Було підготовлено фаговий коктейль з високим титром ($\geq 10^{10}$ БУО/мл), що містив фаги, активні проти п'яти клінічно значущих бактеріальних видів: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Streptococcus pyogenes*. Коктейль змішували зі автологічним i-PRF під час

його полімеризації. Отримані фібринові блоки інкубували у фізіологічному розчині при температурі 36 ± 1 °C протягом семи діб.

У визначені часові точки проводили кількісну оцінку та визначали інфекційну активність десорбованих бактеріофагів методом бляшкоутворення. Дослідження показало стабільне вивільнення та збереження інфекційної активності всіх включених бактеріофагів протягом усього періоду спостереження. Отримані результати підтверджують доцільність використання i-PRF як біосумісної та біодеградуваної матриці для тривалої локальної доставки бактеріофагів.

Такий підхід є перспективним доповненням до профілактики та лікування інфекційних ускладнень, особливо в умовах хірургічного втручання.

Ключові слова: фібриновий клей, i-PRF (ін'єкційний фібриновий клей, збагачений тромбоцитами), бактеріофаги, місцеве депо антибактеріальних засобів.

PROSPECTS FOR THE USE OF AUTOLOGOUS FIBRIN GLUE WITH BACTERIOPHAGES IN TRAUMATOLOGY AND ORTHOPEDICS

Poniatovskiy V. A., Shyrobokov V. P., Linenko O. M., Liutko O. B.

Abstract. Injectable platelet-rich fibrin (i-PRF) is widely used in various fields of medicine due to its regenerative properties. Its potential as a carrier for local delivery of biologically active agents has recently attracted considerable interest. In particular, the incorporation of bacteriophages – viruses that specifically lyse bacteria, including multidrug-resistant strains – into i-PRF represents a novel strategy for combating antibiotic-resistant infections.

This study aimed to evaluate the compatibility and stability of different bacteriophage types incorporated into polymerized i-PRF, assess the dynamics of their release from fibrin scaffolds, and determine the lytic activity of desorbed phages. A high-titer ($\geq 10^{10}$ PFU/mL) cocktail containing phages active against five clinically relevant bacterial species (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Streptococcus pyogenes*) was prepared. The phage cocktail was mixed with freshly prepared autologous i-PRF during the polymerization phase. The resulting fibrin blocks were incubated in physiological saline at 36 ± 1 °C for seven days.

At defined time points, the number and infectivity of released phages were determined using standard plaque assay techniques. The study demonstrated sustained release and maintained infective potential of all included bacteriophages throughout the observation period. These findings support the feasibility of using i-PRF as a biocompatible and biodegradable matrix for the prolonged, localized delivery of bacteriophages.

This approach may offer a promising adjunctive tool in the prevention and treatment of infectious complications, particularly in surgical settings.

Key words: fibrin glue, i-PRF (injectable Platelet-Rich Fibrin), bacteriophages, local depot of antibacterial agents.

ORCID and contributionship / ORCID автора та його внесок до статті:

Poniatovskiy V. A.: <https://orcid.org/0000-0002-1503-3935>^{BDE}

Shyrobokov V. P.: <https://orcid.org/0000-0003-0882-148X>^{AF}

Linenko O. M.: <https://orcid.org/0000-0001-9495-630X>^{BDE}

Liutko O. B.: <https://orcid.org/0000-0001-8233-3041>^{BC}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Poniatovskiy Vadym Anatoliiovych / Понятовський Вадим Анатолійович

Bogomolets National Medical University / Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Ukraine, 03057, Kyiv, 34 Veresteiskiy Ave. / Адреса: Україна, 03057, м. Київ, пр. Берестейський 34

Tel.: +380664239055 / Тел.: +380664239055

E-mail: v.poniatovskiy@gmail.com

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Received 28.01.2025 / Стаття надійшла 28.01.2025 року
Accepted 01.05.2025 / Стаття прийнята до друку 01.05.2025 року