

DOI 10.29254/2077-4214-2026-1-180-222-238

UDC 615.28+615.33+616.15+616.314-089

Yevchuk Yu. I., Pantus A. V., Kutsyk R. V., Rozhko M. M.,

Yarmoshuk I. R., Buherchuk O. V., Kovalchuk N. Ye.

STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND DISTRIBUTION OF DIFFERENT GROUPS OF ANTIBIOTICS IN BLOOD PLASMA AND THE FIBRIN SCAFFOLD OBTAINED BY US

Ivano-Frankivsk National Medical University (Ivano-Frankivsk, Ukraine)

yraevchyk77@gmail.com

The article examines the efficiency of retention and distribution of different groups of antibiotics in a fibrin clot and blood plasma, as well as their effect on the concentration of growth factors. The aim of the study was to investigate the features of antibiotic concentration distribution in different blood fractions and in the fibrin matrix, and to identify the possible effect of their concentrations on the mechanical integrity of such a scaffold and on the concentration of growth factors within it. To evaluate the concentration of the antibiotic in fibrin scaffolds, its distribution in different phases of the experimental system was analyzed. Serum obtained 15 minutes after centrifugation was analyzed, as well as serum isolated after compression of the fibrin clot and the eluate of the compressed fibrin clot. The results of the study showed that, in contrast to cefazolin, lincomycin much more actively saturated the fibrin-platelet clot. Its uniform distribution among all elements of the experimental system was observed only at the minimal saturation dose (0.2 ml of lincomycin solution 300 mg/ml / 7.8 ml of blood). When higher doses of lincomycin (0.4-0.8 ml) were used for saturation, its active incorporation into the fibrin matrix was observed. Ciprofloxacin, in contrast, demonstrated a lack of tendency to accumulate in the fibrin scaffold, as evidenced by a 4-16-fold decrease in its concentrations in the eluates of compressed clots compared with the corresponding samples of pressed serum. Comparative analysis of lincomycin, cefazolin, and ciprofloxacin showed a significant decrease in the concentration of VEGF-A to 43.37 ± 7.44 pg/ml and a decrease in the concentration of PDGF-AA to 80.57 ± 5.41 pg/ml specifically when cefazolin was added. Thus, the concentrations of antibiotics used in this study are sufficient to ensure an antimicrobial effect, provided that the microorganisms do not exhibit resistance to these agents.

Key words: bone tissue, tissue regeneration, microbiological research, antimicrobial effect, fibrin matrix, antibacterial therapy.

Connection of the publication with planned research work.

The paper is part of the comprehensive research project "Clinical and experimental justification of modern methods for the diagnosis, prevention, and treatment of dental diseases," state registration number 0124U003547.

Introduction.

Analysis of the literature indicates that the most commonly used materials for bone tissue restoration are biomaterials based on tricalcium phosphate and hydroxyapatite [1, 2, 3]. However, the use of such materials often leads to bone compaction in the implantation area.

A number of studies focus on the development and application of other structural materials that function as passive scaffolds and serve as carriers for cells or other bioactive components [4, 5, 6]. Among such materials, autologous materials, such as PRF (Platelet-Rich Fibrin), occupy a special place in regenerative medicine and are currently considered the "gold standard" of regenerative medicine. Obtained from the patient's own blood, this fibrin matrix functions both as a passive scaffold and directly influences proliferation processes through the expression of growth factors [7, 8, 9, 10, 11]. The application of these materials has also found its place in dentistry during third molar extraction procedures [12], as well as in other surgical interventions [13, 14, 15]. At present, the use of this autologous material is mainly described in two forms: gel-like and injectable [15, 16, 17].

Currently, a large number of laboratory and experimental studies have investigated the properties of autologous plasma. In particular, it has been established

that L-PRF, obtained from blood fractions and rich in platelets and leukocytes, significantly influences wound regeneration [18, 19]. Several authors, including Kim BJ, Kwon TK, and others, have studied the combination of PRF with bone graft materials, particularly with recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2) [20]. Analysis of existing techniques for combining bone graft material with PRF has demonstrated the use of injectable PRF as a source of growth factors and as a binding component for material granules. Although the obtained injectable form of PRF contains a number of important components necessary for regeneration and, due to its consistency, is the only form that allows full mixing of material granules, the main disadvantage of this technique remains the lack of mechanical stability of such a combined scaffold.

In contrast, another technique for obtaining PRF concentrates leads directly to the formation of a mechanically stable gel-like scaffold during centrifugation. Confirmation of this was provided by the comparative study conducted by De Almeida Nóbrega Correia Pascoal M, which evaluated the tensile strength of such fibrin scaffolds [21, 22]. Considering that a gel-like fibrin scaffold is already formed in the blood collection tube during centrifugation, it becomes impossible to integrate a bone matrix into it.

It should also be noted that surgical intervention in the oral cavity makes any surgical wound potentially infected with bacterial flora. In this regard, one of the priority tasks of modern regenerative medicine is the development of materials not only with osteoconductive and osteoinductive properties, but also with a pronounced local controlled antibacterial effect [23, 24].

Taking into account the results of the above-mentioned studies, we believe that combining a mechanically stable fibrin scaffold with an integrated bone matrix and an antibiotic will allow us to obtain an osteoconductive scaffold with osteogenic potential and a local prolonged antibacterial effect. Therefore, during the development of a method for obtaining such scaffolds in our experimental study, particular attention was focused on investigating the ability of these systems to retain antibacterial agents.

The aim of the study.

To determine the characteristics of the distribution of antibiotic concentrations in different blood fractions and in the fibrin matrix, and to identify the possible effect of these concentrations on the mechanical integrity of such a scaffold and on the concentration of growth factors within it.

Object and research methods.

For the experimental study, blood samples from patients (n=90) were collected immediately before surgical intervention for bone grafting with the addition of a PRF membrane. Blood was collected into several tubes, one of which contained antibiotics used exclusively for the experimental procedures. The study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki, the Council of Europe Convention on Human Rights and Biomedicine, and the relevant legislation of Ukraine.

To analyze antibiotic concentrations in the fibrin scaffold, a microbiological study was performed using three main osteotropic antibiotics: cefazolin (CZO, Borshchahivskiy Chemical-Pharmaceutical Plant, Ukraine, 250 mg/ml), lincomycin (LIN, Pharmaceutical Company "Darnitsa", Ukraine, 300 mg/ml), and ciprofloxacin (CIP, Pharmaceutical Company "Darnitsa", Ukraine, 2 mg/ml). For this experimental study, a fibrin matrix was obtained using the methodology previously described by the authors (Patent No. 159941. A61L 31/00, A61L 33/00, published 23.07.2025).

Centrifugation of blood impregnated with antibiotics was performed as follows: 12 minutes at 2500 rpm, followed by 3 minutes at 3000 rpm. During centrifugation, all fibrin matrix samples were impregnated with antibiotics at the following concentrations: 7.8 ml blood + 0.2 ml antibiotic; 7.6 ml blood + 0.4 ml antibiotic; 7.4 ml blood + 0.6 ml antibiotic; 7.2 ml blood + 0.8 ml antibiotic. When determining the required antibiotic concentration for impregnation, the sensitivity of the sensor microbial culture to these antibiotics was taken into account.

To determine the concentrations of the indicated antibacterial agents, a clinical strain of *S. aureus* was used as a biosensor culture. This antibiotic-sensitive bacterial strain was identified according to the recommendations of Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria [25]. Using the broth microdilution method [26], the MIC (minimum inhibitory concentrations) for the three antibiotics were determined: cefazolin – 0.305 µg/ml, lincomycin – 5.86 µg/ml, and ciprofloxacin – 0.156 µg/ml.

To evaluate the degree of accumulation of each antibiotic in the fibrin scaffold, its distribution was studied in the following experimental fractions:

1. Blood serum obtained 15 minutes after centrifugation.

2. Blood serum isolated from the formed fibrin clot after compression using a PRF-BOX.

3. The eluate of the compressed fibrin clot. To obtain the eluate, the clot was first compressed, weighed under sterile conditions, and then mixed with sterile physiological saline in a volume equivalent to its mass (m/v 1:1). Antibiotic elution was performed using a MR-1 shaker (SIA BIOSAN, Latvia) at a mixing frequency of 20 rpm for 10 minutes at room temperature.

Measurement of antibiotic content in the samples was performed using the Kirby–Bauer disk diffusion test [27]. In addition, the broth microdilution method was also applied [27, 28].

The disk diffusion test [28] was performed on Petri dishes with Mueller–Hinton agar (HiMedia Laboratories Pvt Ltd., India). Since the size and shape of the microbial growth inhibition zones depend on the depth and uniformity of the agar layer, 25 ml of agar was poured into 100-mm Petri dishes placed on a perfectly level surface, resulting in a medium layer thickness of 4.0 ± 0.5 mm. From a 24-hour culture of the sensor strain *S. aureus*, a suspension was prepared with an optical density corresponding to 0.5 McFarland standard (approximately 1.5×10^8 CFU/ml). A volume of 1.000 ml of standardized microbial suspension was applied to the culture medium in each Petri dish and evenly distributed over the surface using a spreader. The inoculated dishes were dried at room temperature for 10-15 minutes.

Selected serum samples (undiluted and diluted 1:10 and 1:100) were applied to sterile paper disks in volumes of 2 µl. Paper disks with serum samples, compressed fibrin clots, and antibiotic disks (Pharmactiv LLC, Ukraine) were placed on the surface of the medium. The diameters of the inhibition zones of the test culture were measured after 24 hours of incubation at 37°C. Digital images of the culture plates were processed using the computer program UTHSCSA ImageTool 2.0 (The University of Texas Health Science Center in San Antonio, ©1995-1996). Mean inhibition zone diameters were calculated based on the results of three independent experiments.

Antibiotic concentrations in the samples were determined using the broth microdilution method [2, 3, 4]. The initial antibiotic solutions used for saturation of fibrin clots served as controls. In a horizontal row of wells of a flat-bottom polystyrene microplate (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), 100 µl of Mueller–Hinton broth (HiMedia Laboratories Pvt Ltd., India) was aseptically added to each well. In the first well, 100 µl of the tested sample (previously diluted 1:100 with isotonic solution) was added. Twofold serial dilutions of the tested sample were obtained by the transfer method. In another horizontal row, twofold serial dilutions of the antibiotic were prepared in the same manner. Control wells (culture growth control) contained only nutrient broth. Subsequently, 50 µl of a standardized suspension of the sensor strain *S. aureus* (final concentration 5×10^5 CFU/ml) was added to all wells. To ensure statistically reliable data, the study was performed simultaneously in three microplates under identical conditions.

The inoculated microplates were incubated for 24 hours at 37°C in a static incubator MIR-162 (SANYO Electric Biomedical Co. Ltd., Japan). Immediately after inoculation and after 24 hours of incubation, the growth of cultures in the wells was assessed by measuring the

optical density (OD) of the medium at 600 nm using a Synergy™ HTX spectrophotometer (BioTek Instruments Inc., USA). To obtain statistically reliable data on MIC values, measurements were performed in parallel in three microplates, after which mean OD values for each well were calculated. Considering the actual MIC value of the antibiotic for the sensor culture and the dilution level of the tested sample that produced similar growth characteristics of the sensor culture, the antibiotic concentration in the sample was calculated based on mean OD values. All experiments were performed in triplicate.

To determine the influence of antibiotics on the inductive properties of the fibrin scaffold, concentrations of the growth factors VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor A) and PDGF-AA (Platelet-Derived Growth Factor AA) were measured in fractions obtained under different centrifugation protocols: L-PRF, A-PRF, I-PRF, and Sticky Bone, according to the standard protocol for preparation of PRF concentrates, as well as experimental centrifugation modes including 2500 rpm (12 min) + 3000 rpm (3 min) (Experimental A) and 2000 rpm (12 min) + 2500 rpm (3 min) (Experimental B) (Patent No. 159941. A61L 31/00, A61L 33/00, published 23.07.2025). Prior to centrifugation, the above-mentioned antibiotics were added to each of the six fractions. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of the liquid plasma fraction obtained after compression of the fibrin clot was performed according to the standard protocol using an ELISA kit. The optical density (OD) of each well was measured at a wavelength of 450 nm using an ER500 microplate reader.

Statistical analysis of the results was performed using Microsoft Excel 2016 (Microsoft 365) and R (RStudio 2025.05.1, Posit Software, PBC). To test the significance of differences between the studied samples, Welch's one-way ANOVA was applied. When significant differences were detected, intergroup differences were assessed using the Student's t-test with Bonferroni correction for multiple comparisons.

Research results and their discussion.

The sensor microbial culture used in the study (*S. aureus*) is characterized by sensitivity to β -lactam antibiotics, lincosamides, and fluoroquinolones. At the preparatory stage, using the broth serial dilution method, it was established that its growth was completely inhibited by cefazolin at a concentration of 0.305 $\mu\text{g/ml}$, lincomycin at 5.86 $\mu\text{g/ml}$, and ciprofloxacin at 0.156 $\mu\text{g/ml}$.

The addition of an antibiotic solution to the blood before clot formation ensures its incorporation into the structure of the formed fibrin-platelet matrix. The antibiotic captured by the clot may localize either in the liquid phase filling the clot or be retained by the protein structure of the fibrin-platelet matrix. To clarify this issue, the formed fibrin clot was subjected to compression, resulting in the extraction of serum pressed out from its structure and the formation of a compressed fibrin scaffold (the so-called membrane form). The compressed clot contains only a small volume of liquid, indicating that the antibiotics are incorporated into its protein framework. All elements of the experimental system were tested separately for the presence of antibiotics. In addition, the antibiotic concentration was determined in the serum formed

during the natural clot retraction within 15 minutes of its formation. Such a methodological approach allowed evaluation of the distribution of the antibiotic among all phases of the experimental system.

All tested samples containing antibiotics demonstrated significant antibacterial activity ($p < 0.05$) compared with control samples obtained by incorporating the fibrin clot with isotonic solution.

Qualitative detection of the presence of the antibiotic (CZO) in all elements of the experimental system was performed using the disk diffusion method (table 1, fig. 1). Antibacterial activity against the sensor culture *S. aureus* was detected in all sampled fractions, as evidenced by the diameters of the growth inhibition zones. However, it should be noted that the largest inhibition zone diameters ($p < 0.05$) were observed for the cefazolin solution used for saturation, compared with serum samples obtained from the compressed fibrin scaffold and from natural clot retraction. These findings reflect a uniform distribution of the antibiotic among the different blood fractions used for PRF formation. A similar pattern was observed when testing samples diluted 10-fold and 100-fold. A proportional decrease in the inhibition zone diameters of the sensor culture *S. aureus* was recorded with increasing dilution of the serum samples.

The study also demonstrated the presence of cefazolin in the membrane form of PRF. Since the entire compressed fibrin clot was used for testing in each experiment, the inhibition zone diameters of the sensor culture in some cases even exceeded the control values obtained for the antibiotic solution. It should be noted that the addition of higher doses of cefazolin solution to the experimental system (0.6 ml per 7.4 ml blood and 0.8 ml per 7.2 ml blood) led to deterioration of the mechanical properties of the formed clot: a very delicate fibrin framework was formed, which was mechanically unstable and difficult to compress.

Thus, the series of preliminary experiments demonstrated the presence of the antibiotic (CZO) in all elements of the experimental system – both in the serum expressed from the fibrin clot and in the membrane form of PRF. However, the disk diffusion method provides only qualitative results. It does not allow accurate determination of the antibiotic concentration in the tested sample and therefore does not permit a definitive conclusion regarding its distribution among the individual elements of the experimental system.

Therefore, the aim of the next stage of the study was the quantitative determination of antibiotic content in experimental PRF samples. For this purpose, the serial dilution method, which is more accurate and sensitive, was applied. To exclude the possible influence of serum factors on the growth of the sensor culture *S. aureus*, a series of control experiments with serum without antibiotics was performed. Analysis of the growth curves, constructed based on the real-time measurement of optical density of the medium (every hour for 24 hours), demonstrated no significant effect of intact blood serum at the tested concentrations on the growth intensity of the sensor culture.

Experiments on the saturation of the fibrin clot were conducted using three antimicrobial agents – cefazolin, lincomycin, and ciprofloxacin. The *S. aureus* strain used as the sensor culture demonstrated high sensitivity to

Table 1 – Antimicrobial activity of the elements of the fibrin clot saturated with cefazolin (diameters of growth inhibition zones of the sensor culture *S. aureus*, mm)

Tested samples		Calculated CZO concentration in samples, µg/mL	Sample dilution		
			Undiluted	1:10	1:100
Antibiotic monitoring	CZO	250	40.19±0.37	34.15±0.51	28.06±0.45
Control 7.2 ml of blood + 0.8 ml of isotonic solution	Serum	0	0	0	0
	Serum from the clot		0	0	0
	Compressed clot		0	NT	NT
7.8 ml of blood + 0.2 ml of CZO	Serum	6.25 (dilution 1:40)	34.70±0.79 ^{*/†}	26.23±0.28 ^{*/†}	18.61±0.26 ^{*/†}
	Serum from the clot		31.48±0.31 ^{*/†}	23.98±0.49 ^{*/†}	16.72±0.11 ^{*/†}
	Compressed clot		46.71±1.53 ^{*/†}	NT	NT
7.6 ml of blood + 0.4 ml of CZO (dilution of CZO 1:20)	Serum	12.5 (dilution 1:20)	29.97±0.34 ^{*/†}	26.12±0.27 ^{*/†}	17.16±0.22 ^{*/†}
	Serum from the clot		29.14±0.25 ^{*/†}	25.39±0.28 ^{*/†}	16.34±0.17 ^{*/†}
	Compressed clot		44.53±0.52 ^{*/†}	NT	NT
7.4 ml of blood + 0.6 ml of CZO	Serum	18.75 (dilution 1:13)	28.02±0.26 ^{*/†}	22.83±0.43 ^{*/†}	18.06±0.42 ^{*/†}
	Serum from the clot		32.10±0.27 ^{*/†}	23.67±0.32 ^{*/†}	18.16±0.35 ^{*/†}
	Compressed clot		41.09±0.48 [†]	NT	NT
7.2 ml of blood + 0.8 ml of CZO	Serum	25 (dilution 1:10)	29.62±0.17 ^{*/†}	25.06±0.19 ^{*/†}	17.56±0.23 ^{*/†}
	Serum from the clot		29.98±0.25 ^{*/†}	22.43±0.32 ^{*/†}	16.63±0.26 ^{*/†}
	Compressed clot		39.27±0.40 [†]	NT	NT

Notes: NT – the compressed clot was tested in its intact form without dilution; * – $p < 0.05$ compared with the control CZO solution; † – $p < 0.05$ compared with the control without antibiotic.

these antibiotics: MIC of cefazolin – 0.305 µg/ml, MIC of lincomycin – 5.86 µg/ml, and MIC of ciprofloxacin – 0.156 µg/ml. To obtain statistically reliable data, dilution testing of each sample was performed in parallel in three microplates, after which the mean OD values were calculated for each dilution. Individual OD values in parallel wells of the plates were used for variance analysis. Taking into account the actual MIC value of the antibiotic for the sensor culture and the dilution level of the tested sample that produced similar growth characteristics of the sensor culture, the antibiotic concentration in the sample was calculated based on the mean OD values. The results of testing individual elements of the fibrin clots are presented in **table 2**.

In experiments on PRF saturation with cefazolin, when 0.2 ml of cefazolin solution (250 mg/ml) was added to 7.8 ml of blood, the incorporation of the antibiotic into the fibrin-platelet matrix occurred only to a limited extent. In the serum expressed from the clot, its concentration was twofold lower, and in the eluate of the compressed clot it was fourfold lower than in the retracted serum ($p < 0.05$). In general, cefazolin demonstrated a low ability to incorporate into the protein structure of the fibrin-platelet matrix. With an increase in the antibiotic dose in the experimental system (0.4 ml / 7.6 ml blood and 0.8 ml / 7.2 ml blood), its concentration in the eluate of the compressed clot remained twofold lower than in the retracted serum ($p < 0.05$). Only in the experiment

Table 2 – Concentration of antibiotics in the elements of fibrin clots under different saturation regimens

Components of the experimental system		Calculated antibiotic concentration in the system, mg/ml	Determined antibiotic concentration, mg/ml		
Antibiotic	Blood		Serum after clot retraction	Serum expressed from the clot	Compressed clot
Cefazolin, 250 mg/ml					
0.2 ml	7.8 ml	6.25	3.91	1.95*	0.49*
0.4 ml	7.6 ml	12.5	3.91	7.81*	1.95*
0.6 ml	7.4 ml	18.75	15.63	15.63	15.63
0.8 ml	7.2 ml	25.0	7.81	15.63	3.91*
Lincomycin, 300 mg/ml					
0.2 ml	7.8 ml	7.5	4.7	4.7	4.7
0.4 ml	7.6 ml	15.0	9.4	18.75*	9.4
0.6 ml	7.4 ml	22.5	9.4	18.75*	4.7*
0.8 ml	7.2 ml	30.0	18.75	9.4*	18.75
Ciprofloxacin, 2.0 mg/ml					
0.2 ml	7.8 ml	50	0.0625	0.0156*	0.0039*
0.4 ml	7.6 ml	100	0.125	0.0625*	0.0039*
0.6 ml	7.4 ml	150	0.125	0.0625*	0.0156*
0.8 ml	7.2 ml	200	0.125	0.250*	0.03125*

Notes: 1 – antibiotic concentrations were calculated based on the mean optical density (OD) values of the cultures obtained from three independent experiments; 2 – $p < 0.05$ compared with the antibiotic concentration in the serum obtained after natural clot retraction during the first 15 minutes of its formation.

with 0.6 ml cefazolin / 7.4 ml blood was its uniform distribution among all elements of the system observed.

Unlike cefazolin, lincomycin demonstrated a significantly greater ability to saturate the fibrin-platelet clot. Its uniform distribution among all elements of the experimental system was observed only at the minimal saturation dose (0.2 ml of lincomycin solution 300 mg/ml / 7.8 ml of blood). When higher doses of lincomycin (0.4-0.8 ml) were used for saturation, its active incorporation into the PRF structure was observed. In this case, the major proportion of the antibiotic was localized in the liquid phase filling the fibrin scaffold. This is evidenced by a twofold increase in the concentration of lincomycin

in the serum expressed from the clot, compared with the serum formed during natural clot retraction ($p < 0.05$). When 0.8 ml of lincomycin solution was used to saturate 7.2 ml of blood, maximal incorporation of the antibiotic into the protein fibrin framework of the clot was observed. It was established that its concentration in the eluate of the compressed clot was twice as high as in the serum expressed from it.

The concentration of ciprofloxacin in the eluates of compressed clots in all experimental variants was 4-16 times lower than in the samples of expressed serum and 4-32 times lower than in the retracted serum ($p < 0.05$).

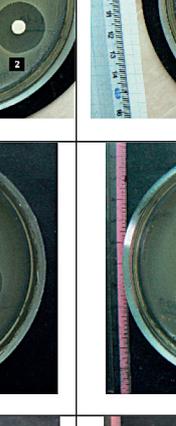
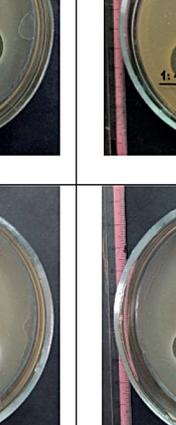
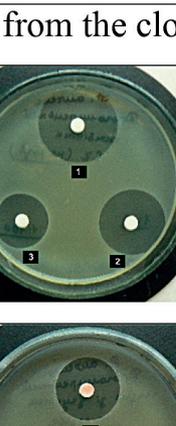
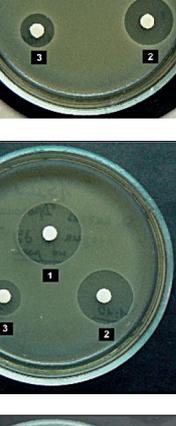
	Serum	Serum from the clot	Compressed clot
Control. CZO. 250 $\mu\text{g/ml}$			
7.8 ml of blood + 0.2 ml of CZO			
7.6 ml of blood + 0.4 ml of CZO			
7.4 ml of blood + 0.6 ml of CZO			
7.2 ml of blood + 0.8 ml of CZO			

Figure 1 – Inhibition of the growth of the sensor culture *S. aureus* by elements of the fibrin clot saturated with cefazolin (1 – undiluted sample; 2 – dilution 1:10; 3 – dilution 1:100).

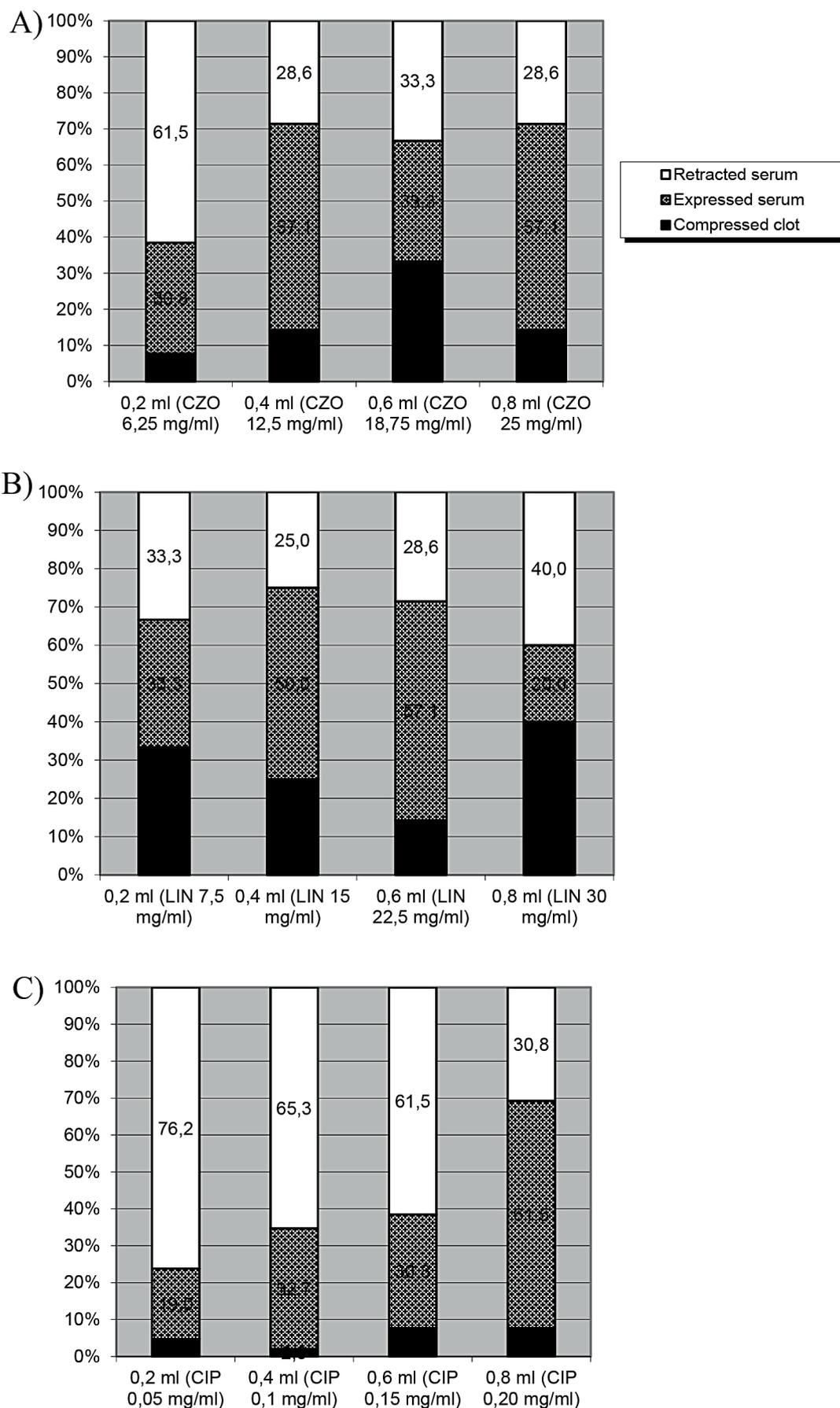


Figure 2 – Relative distribution of cefazolin (A), lincomycin (B), and ciprofloxacin (C) among PRF elements under different saturation regimens.

Table 3 – Concentration of growth factors in blood plasma after the addition of antibiotics

Blood fractions	VEGF-A pg/ml With added antibiotic	PDGF-AA pg/ml With added antibiotic	VEGF-A pg/ml Control	PDGF-AA pg/ml Control
L-PRF	47.72±8.62 [†]	92.05±0.39 [†]	48.96±9.69 [†]	91.37±0.57 [†]
A-PRF	58.18±15.13 [†]	89.99±1.37 [†]	67.19±14.14 [†]	84.63±4.51 [†]
I-PRF	99.02±24.24	75.60±5.67 [†]	117.95±26.69 [†]	71.51±6.29 [†]
Sticky bone	94.66±13.78 [†]	62.07±6.26 [†]	97.16±13.00 [†]	65.17±4.55 [†]
Experimental A	96.20±7.81 [†]	86.68±3.41 [†]	109.22±13.35 [†]	86.64±3.65
Experimental B	135.08±46.20	80.14±4.21 [†]	165.14±42.06 [†]	78.35±4.44 [†]

Notes: * – p<0.05 compared to the control group; † – p<0.05 when comparing blood fractions.

This finding indicates its low tendency to incorporate into the protein framework of PRF.

The pattern of the relative distribution of antibiotics among the elements of the experimental systems is clearly illustrated by the diagrams presented in **figure 2**. During PRF saturation with cefazolin (**fig. 2A**) and lincomycin (**fig. 2B**), approximately 70% of the antibiotic introduced into the system becomes incorporated into the clot. An exception was observed when the minimal saturation dose of cefazolin (0.2 ml solution / 7.8 ml blood) was used, where only about 40% of the antibiotic was incorporated into the clot. In contrast, PRF saturation with ciprofloxacin (**fig. 2C**) occurred much less efficiently.

As a result of PRF saturation with antibiotics, a significant proportion of the drugs is located in the liquid phase retained by the protein fibrin scaffold. A smaller fraction of all tested drugs is incorporated directly into the protein framework of the fibrin matrix. Among the tested antibiotics, ciprofloxacin demonstrated the weakest ability to incorporate into PRF, particularly into its fibrin framework. During the analysis of the obtained fibrin matrices, we also observed a significant decrease in their mechanical properties when high doses of antibiotic solutions (0.8 ml / 7.2 ml blood) were added to the experimental system. This resulted in the formation of a mechanically unstable fibrin scaffold. We determined that the optimal saturation regimens were 0.4 ml or 0.6 ml of antibiotic solution with 7.6 ml or 7.4 ml of blood, respectively. Under these conditions, optimal incorporation of all tested antibiotics into the PRF structure was achieved without negatively affecting the physical properties of the clot.

Taking into account the results of the microbiological studies, particularly the distribution pattern of antibiotics in blood fractions and the negative effect of high doses of antibiotic solutions on the mechanical stability of the fibrin scaffold, the optimal dose of antibiotics used to determine their influence on growth factor concentrations did not exceed 0.4 ml / 7.6 ml blood.

As shown in **table 3**, no differences in growth factor concentrations were observed between plasma fractions containing incorporated antibiotics and the control values. However, significant differences were detected between plasma fractions obtained using different centrifugation protocols. In particular, after antibiotic incorporation, a significantly higher concentration of VEGF-A was observed in the Sticky Bone and Experimental A methods compared with L-PRF and A-PRF concentrates. In contrast, in plasma fractions containing incorporated antibiotics, the PDGF-AA concentration was significantly higher in L-PRF, A-PRF,

Experimental A, and Experimental B compared with I-PRF and Sticky Bone. Comparative analysis of lincomycin, cefazolin, and ciprofloxacin demonstrated a significant decrease in growth factor concentrations in samples containing cefazolin. Specifically, in samples with cefazolin, the VEGF-A concentration was 43.37±7.44 pg/ml, which was significantly lower (p<0.001) than that observed with lincomycin

(157.50±26.95 pg/ml) and significantly lower (p<0.05) than with ciprofloxacin (108.72±24.23 pg/ml). A similar trend was observed in the analysis of PDGF-AA, where the concentration of this factor in samples containing cefazolin was 80.57±5.41 pg/ml, which was significantly lower (p<0.05) than with lincomycin (92.23±0.39 pg/ml) and lower than with ciprofloxacin (91.38±0.65 pg/ml).

Analysis of the influence of antibacterial agents on the formation of a fibrin scaffold was also performed by Polak D, Clemer-Shamai N, and Shapira L, who demonstrated that high concentrations of antibiotics may negatively affect the formation of the fibrin framework structure. However, low concentrations up to 0.5 ml of these agents did not significantly affect PRF [23]. Based on the results reported by these authors and comparing them with our observations, it can be noted that the optimal antibiotic concentration for the impregnation of fibrin–bone scaffolds is up to 0.4 ml of lincomycin. The importance of using low concentrations of the drug was also emphasized by Shaochuan Wang and Youbin Li [24]. Specifically, the authors confirmed that antibiotics loaded into platelet-rich plasma (PRP) may reduce the concentration of growth factors released from PRP and may disrupt the structure of the fibrin matrix depending on the concentration of the loaded antibiotic. It was demonstrated that lower antibiotic doses preserved their antimicrobial effect without affecting the released growth factors and without altering the structure of the fibrin network. Analysis of previous studies also indicated a pronounced antimicrobial effect in collagen and polymeric microfibrinous scaffolds [29]. In experiments involving antibiotic incorporation into these scaffolds, cefazolin proved to be the most stable over an extended period of time. However, compared with the fibrin matrix, the polymeric scaffold appeared to be mechanically less sensitive to the influence of antibiotics. Thus, the antibiotic concentrations used in our study appear to be sufficient to ensure an antimicrobial effect, provided that microorganisms do not exhibit resistance to these drugs.

Conclusions.

1. Unlike cefazolin, lincomycin demonstrated a significantly greater ability to saturate the fibrin-platelet clot. Its uniform distribution among all elements of the experimental system was observed only at the minimal saturation dose (0.2 ml of lincomycin solution 300 mg/ml / 7.8 ml of blood).

2. Comparative analysis of the antibiotics demonstrated a significant decrease in the concentration of VEGF-A to 43.37±7.44 pg/ml and PDGF-AA to 80.57±5.41 pg/ml when cefazolin was added, which may indicate suppression of synthesis or degradation of

these signaling proteins during the formation of platelet concentrates.

Prospects for further research.

The results obtained in our study demonstrate the effectiveness of antibiotic retention in fibrin scaffolds. Determination of the distribution of antibiotics in different blood fractions during centrifugation provides

a basis for further clinical studies aimed at evaluating the effectiveness of local drug release in the wound. In addition, further investigation of the mechanisms by which different groups of antibiotics influence growth factor concentrations may represent a promising direction for future research.

DOI 10.29254/2077-4214-2026-1-180-222-238

УДК 615.28+615.33+616.15+616.314-089

Євчук Ю. І., Пантус А. В., Куцик Р. В., Рожко М. М., Ярмошук І. Р., Бугерчук О. В., Ковальчук Н. Є.

ВИВЧЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ ТА ХАРАКТЕРУ РОЗПРИДІЛЕННЯ РІЗНИХ ГРУП АНТИБІОТИКІВ У ПЛАЗМІ КРОВІ ТА ОТРИМАНОМУ НАМИ ФІБРИНОВОМУ СКАФФОЛДІ

Івано-Франківський національний медичний університет (м. Івано-Франківськ, Україна)

yraevchuk77@gmail.com

У статті розглядається ефективність утримання, розподілення різних груп антибіотиків у фібриновому згустку та плазмі крові, а також їхній вплив на концентрацію факторів росту. Метою дослідження було вивчення особливості розподілу концентрації антибіотиків у різних фракціях крові і фібриновому матриксі та виявити можливий вплив їхніх концентрацій на механічну цілісність такого каркасу та на концентрацію в ньому факторів росту. Щоб провести оцінку концентрації антибіотика у фібринових скаффолдах було вивчено його розподіл у різних фазах експериментальної системи. Проводили аналіз сироватки, яка утворилась через 15 хвилин після центрифугування, сироватки крові виділену після відтискування фібринового згустку та аналіз елюату відтиснутого фібринового згустку. Результати дослідження показали, що на відміну від цефазоліну, лінкоміцин значно активніше насичував фібриново-тромбоцитарний згусток. Рівномірний його розподіл між усіма елементами експериментальної системи спостерігали лише при мінімальній дозі насичення (0,2 мл розчину лінкоміцину 300 мг/мл / 7,8 мл крові). При застосуванні для насичення більших доз (0,4-0,8 мл) лінкоміцину спостерігали його активну інкорпорацію у фібриновий матрикс. Ципрофлоксацин, навпаки, продемонстрував свою неохочість до накопичення у фібриновому каркасі, про що свідчили зниження до 4-16 разів його концентрацій в елюатах відтиснутих згустків, у порівнянні з відповідними зразками відпресованих сироваток. Порівняльний аналіз між лінкоміцином, цефазоліном та ципрофлоксацином показав достовірне зниження до $43,37 \pm 7,44$ pg/ml концентрації VEGF-A фактору та зниження до $80,57 \pm 5,41$ pg/ml концентрації PDGF-AA фактору саме при додаванні цефазоліну. Отже, застосовані нами концентрації антибіотиків є цілком достатніми для забезпечення протимікробного ефекту при умові відсутності у мікроорганізмів резистентності до цих препаратів.

Ключові слова: кісткова тканина, регенерація тканини, мікробіологічне дослідження, протимікробний ефект, фібриновий матрикс, антибактеріальна терапія.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Робота є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи «Клініко-експериментальне обґрунтування сучасних методів діагностики, профілактики та лікування стоматологічних захворювань», номер державної реєстрації 0124U003547.

Вступ.

Аналіз літературних даних показує, що найбільш поширеними матеріалами, які використовуються для відновлення кісткової тканини, є біоматеріали на основі трикальцій-фосфату та гідроксиапатиту [1, 2, 3]. Проте, застосування таких матеріалів часто призводить до компактизації кістки в ділянці імплантації.

Ряд досліджень приділяє увагу розробці та застосуванню інших структурних матеріалів, які виконують функцію пасивного каркасу та є носієм клітин чи інших біоактивних компонентів [4, 5, 6]. Серед таких матеріалів особливе місце в регенеративній медицині займають аутологічні матеріали, наприклад PRF (Platelet Rich Fibrin), які на сьогоднішній день є «золотим стандартом» регенеративної медицини. Отри-

маний з власної крові пацієнта такий фібриновий матрикс працює як в якості пасивного каркасу, так і безпосередньо впливає на процеси проліферації за рахунок експресії факторів росту [7, 8, 9, 10, 11]. Застосування вказаних матеріалів знайшло своє місце і в стоматології при операціях видалення третіх молярів [12], а також і при інших хірургічних втручаннях [13, 14, 15]. На сьогоднішній день відмічається застосування такого аутологічного матеріалу в двох основних формах, а саме у гелеподібній та ін'єкційній [15, 16, 17].

На даний час проведено велику кількість лабораторних та експериментальних досліджень властивостей аутологічної плазми. Зокрема, було встановлено, що отримана з фракцій крові L-PRF, яка багата тромбоцитами і лейкоцитами, суттєво впливає на регенерацію ран [18, 19]. Ряд авторів Kim BJ, Kwon TK та інших приділили увагу поєднанню PRF з кістково-пластичним матеріалом, зокрема з рекомбінантним морфогенним білком (rhBMP-2) людської кістки [20]. Аналіз існуючих методик поєднання кістково-пластичного матеріалу з PRF показав засто-

сування так званої ін'єкційної PRF в якості джерела факторів росту та зв'язуючого компоненту гранул матеріалу. Хоча отримана ін'єкційна форма PRF і містить ряд важливих компонентів необхідних для регенерації та за консистенцією є єдиною формою, яка дає можливість повноцінно змішати гранули матеріалу, проте основним недоліком цієї методики залишається відсутність механічної стабільності такого комбінованого скаффолду.

Що стосується іншої методики отримання PRF концентратів, то вона, навпаки, під час центрифугування відразу призводить до утворення механічно стабільного гелеподібного каркасу. Підтвердженням цього є проведене авторами De Almeida Nóbrega Correia Pascoal M порівняльне дослідження міцності на розрив таких фібринових скаффолдів [21, 22]. Враховуючи той факт, що у пробірці для забору крові під час центрифугування вже утворюється гелеподібний фібриновий скаффолд інтегрувати в нього кістковий матрикс неможливо.

Також слід зазначити, що оперативне втручання у ротовій порожнині робить любу хірургічну рану потенційно інфікованою бактеріальною флорою. У зв'язку з цим, найбільш пріоритетним завданням сучасної регенеративної медицини є створення матеріалів не тільки з остеокондуктивним та остеоіндуктивним ефектом, але й з вираженим локальним контрольованим антибактеріальним ефектом [23, 24].

Враховуючи результати наведених вище досліджень, ми вважаємо, що поєднання механічно стабільного фібринового каркасу з інтегрованим в нього кістковим матриксом та антибіотиком дозволить нам отримати остеокондуктивний скаффолд з остеоіндуктивним та локальним пролонгованим антибактеріальним ефектом. Тому саме при розробці методики отримання таких скаффолдів у своєму експериментальному дослідженні ми зосередили свою увагу саме на вивченні можливості утримання антибактеріальних препаратів.

Мета дослідження.

Визначення особливості розподілу концентрації антибіотиків у різних фракціях крові і фібриновому матриксі та виявити можливий вплив їхніх концентрацій на механічну цілісність такого каркасу та на концентрацію в ньому факторів росту.

Об'єкт і методи дослідження.

Для експериментального дослідження забір крові у пацієнтів (n=90) здійснювали безпосередньо перед оперативним втручанням із приводу кісткової пластини з додаванням PRF мембрани. Забір крові здійснювали в декілька пробірок, в одну з яких додавали антибіотики для використання виключно в експерименті. Дослідження проводилось згідно з принципами Гельсінської декларації Всесвітньої охорони прав людини, конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину та положенням відповідних законів України.

Для аналізу концентрації антибіотиків у фібриновому скаффолді ми провели мікробіологічне дослідження з трьома основними видами остеотропних антибіотиків: Цефазолін (CZO, Борщівський ХФЗ, Україна, 250 мг/мл), Лінкоміцин (LIN, Фармацевтична фірма «Дарниця», Україна, 300 мг/мл) та Ципрофлоксацин (CIP, Фармацевтична фірма «Дарниця»,

Україна, 2 мг/мл). Для даного експериментального дослідження нами отримано фібриновий матрикс за описаними нами методиками (Патент № 159941. А61L 31/00, А61L 33/00, опубліковано 23.07.2025). Центрифугування крові з імпрегнованими антибіотиками здійснювали з розрахунку: 12 хвилин на швидкості 2500 об / хв, після чого 3 хвилини на швидкості 3000 об / хв. У процесі центрифугування усі зразки фібринового матриксу були імпрегновані антибіотиком з розрахунку наступних концентрацій: 7,8 мл крові + 0,2 мл антибіотика; 7,6 мл крові + 0,4 мл антибіотика; 7,4 мл крові + 0,6 мл антибіотика; 7,2 мл крові + 0,8 мл антибіотика. При встановленні необхідної концентрації антибіотиків для імпрегнації враховували чутливість до них сенсорної мікробної культури.

З метою визначення концентрацій вказаних нами антибактеріальних препаратів, ми використали клінічний штам *S. aureus* в якості біосенсорної культури. Даний, чутливий до антибіотиків бактеріальний штам, ідентифіковано відповідно до рекомендацій Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria [25]. Використовуючи метод серійних мікророзведень в бульйоні [26] нами було встановлено значення MIC (мінімальних пригнічуючих концентрацій), для трьох антибіотиків: цефазоліну – 0,305 мкг/мл, лінкоміцину – 5,86 мкг/мл, ципрофлоксацину – 0,156 мкг/мл.

Щоб оцінити ступінь накопичення того чи іншого антибіотика у фібриновому скаффолді ми вивчали його розподіл у отриманих нами в експерименті наступних фракцій:

1. Сироватки крові, яка утворилася через 15 хвилин центрифугування.

2. Сироватки крові, виділену із сформованого фібринового згустка після його відтискання за допомогою PRF-BOX.

3. Елюат відтиснутого фібринового згустка. Щоб отримати елюат ми спочатку відтискали згусток, після чого зважували його у стерильних умовах та додавали до нього стерильний фізіологічний розчин в об'ємі, еквівалентному значенню маси (m/v 1:1). Елюцію антибіотика здійснювали на шейкері MR-1 (SIA BIOSAN, Латвія) при частоті перемішування 20 об./хв. впродовж 10 хв. при кімнатній температурі.

Вимірювання вмісту антибіотиків у зразках здійснювали за допомогою диско-дифузійного тесту Kirby-Bauer [27]. Окрім вказаного тесту нами також було застосовано метод серійних мікророзведень в бульйоні [27, 28].

Диско-дифузійний тест [28] виконували на чашках Петрі з агаром Мюллера-Хінтона (HiMedia Laboratories Pvt Ltd., Індія). Оскільки форма та розміри зон пригнічення росту мікроорганізмів залежать від глибини та рівномірності агарового шару, в розташовані на ідеально рівній поверхні чашки Петрі діаметром 100 мм заливали по 25 мл агару, що дозволило отримати шар середовища товщиною $4,0 \pm 0,5$ мм. Із добової культури сенсорного штаму *S. aureus* готували суспензію, оптична густина якої відповідала 0,5 за стандартом Мак Фарланда (приблизно 1.5×10^8 КУО/мл). На поживне середовище в чашці Петрі наносили 1,000 мл стандартизованої мікробної суспензії і рівномірно розподіляли її по поверхні шпателем. Засіяні чашки просували при кімнатній температурі впродовж 10-15 хв.

Відібрані зразки сироватки (не розведених та розведених 1:10 і 1:100) по 2 мкл вносили на стерильні паперові диски. Паперові диски із зразками сироватки, відтиснуті фібринові згустки та диски з антибіотиками (ТОВ «Фармактив», Україна) поміщали на поверхню середовища. Діаметри зон затримки росту тест-культури визначали після культивування в термостаті при температурі 37°C впродовж 24 год. Обробку цифрових зображень посівів на чашках здійснювали за допомогою комп'ютерної програми UTHSCSA ImageTool 2.0 (The University of Texas Health Science Center in San Antonio, ©1995-1996). Середні значення діаметрів зон затримки росту вираховували на основі результатів трьох незалежних дослідів.

Концентрацію антибіотика у зразках визначали за допомогою дослідження методом серійних мікро-розведень в бульйоні [2, 3, 4]. Контролями служили вихідні розчини антибіотиків, які використовувалися для насичення фібринових згустків. У горизонтальний ряд лунок плоскодонного полістиренового планшета (Thermo Fisher Scientific Inc., США) стерильно вносили по 100 мкл бульйону Мюллера–Хінтона (HiMedia Laboratories Pvt Ltd., Індія). В першу лунку вносили 100 мкл досліджуваного зразка (попередньо розведеного 1:100 ізотонічним розчином). Методом перекатів отримували ряд двократних серійних розведень досліджуваного зразка. В іншому горизонтальному ряду аналогічним чином готували двократні серійні розведення антибіотика. У контрольні лунки (контроль росту культури) вносили лише поживний бульйон. Далі в усі лунки вносили по 50 мкл стандартизованої за оптичною густиною суспензії сенсорного штаму *S. aureus* (в кінцевій концентрації 5×10^5 КУО/мл). З метою отримання статистично достовірних даних дослідження проводилось у трьох планшетах одночасно з дотриманням ідентичних умов.

На протязі 24 годин при температурі 37°C проводили інкубацію засіяних планшетів в статичному інкубаторі MIR-162 (SANYO Electric Biomedical Co. Ltd., Японія). Відразу після посіву та після 24 годин інкубації, при довжині хвилі 600 нм, проводили оцінку росту культур в лунках шляхом аналізу оптичної густини середовища (OD), використовуючи спектрофотометр Synergy™HTX (BioTek Instruments Inc., США). З метою отримання достовірних статистичних даних значень MIC (мінімальної пригнічуючої концентрації) вимірювання проводили паралельно у трьох планшетах, після чого вираховували середні значення OD для кожної лунки. Приймаючи до уваги реальне значення MIC антибіотика для сенсорної культури і ступінь розведення досліджуваного зразка, який давав аналогічні характеристики росту сенсорної культури, за середніми значеннями OD обчислювали концентрацію антибіотика у зразку. Усі експерименти виконували тричі.

З метою визначення впливу антибіотика на індуктивні властивості фібринового скаффолду ми визначали концентрації факторів росту VEGF-A (Vascular Endothelial Cell Growth Factor) та PDGF-AA (Platelet Derived Growth Factor) у фракціях отриманих на різних режимах центрифугування: L-PRF, A-PRF, I-PRF, Sticky bone згідно стандартного протоколу приготування PRF концентратів та експериментальні режими центрифугування, що включали 2500 об/хв (12 хвилин), 3000 об/хв (3 хвилини) (Experimental A) та 2000 об/хв

(12 хвилин), 2500 об/хв (3 хвилини) (Experimental B) (Патент № 159941. А61L 31/00, А61L 33/00, опубліковано 23.07.2025). Перед центрифугуванням до кожної із шести фракцій було додано вище вказані нами антибіотики. Імуноферментний аналіз рідкої частини плазми, отриманої відтисканням з фібринового згустка, проводили за стандартним протоколом згідно інструкції за допомогою набору ELISA KIT. Оптичну щільність (OD) кожної лунки визначали на довжині хвилі 450 нм за допомогою мікропланшетного зчитувача ER500.

Статистичний аналіз результатів виконано за допомогою пакетів програм Microsoft Excel 2016 (Microsoft 365), і R (RStudio 2025.05.1, Posit Software, PBC). Для перевірки значущості відмінностей між досліджуваними зразками застосовано однофакторний дисперсійний аналіз Welch's ANOVA Test. Якщо відмінності виявлялися значущими, міжгрупові відмінності перевіряли на значущість за допомогою t-критерію Стьюдента з поправкою Бонферроні для множинного тестування.

Результати дослідження та їх обговорення.

Використана у дослідженнях сенсорна мікробна культура (*S. aureus*) характеризується чутливістю до β-лактамних антибіотиків, лінкозамідів та фторхінолонів. На підготовчому етапі методом серійних розведень в бульйоні було встановлено, що її ріст повністю пригнічується цефазоліном в концентрації 0,305 мкг/мл, лінкоміцином – 5,86 мкг/мл, ципрофлоксацином – 0,156 мкг/мл.

Додавання розчину антибіотика до крові перед формуванням згустка забезпечує його інкорпорацію в структуру утвореного фібриново-тромбоцитарного матриксу. Захоплений згустком антибіотик може локалізуватися у рідкій фазі, яка заповнює його, або утримуватися білковою структурою фібриново-тромбоцитарного матриксу. Для з'ясування цього питання сформований фібриновий згусток піддавали пресуванню, і в результаті одержували відтиснуту з його структури сироватку та спресований фібриновий каркас (так звану мембранну форму). Спресований згусток містить лише невеликий об'єм рідини, що свідчить про інкорпорацію антибіотиків всередину його білкового каркасу. Усі елементи експериментальної системи тестували на присутність антибіотика окремо. Крім того, визначали концентрацію антибіотика в сироватці, яка утворилася в процесі природної ретракції тромба впродовж 15 хв. його формування. Такий методологічний підхід дозволив оцінити розподіл антибіотика між усіма фазами експериментальної системи.

Усі протестовані зразки з антибіотиками показали значну достовірну ($p < 0,05$) антибактеріальну активність, на відміну від контрольних зразків, отриманих шляхом інкорпорації фібринового згустка ізотонічним розчином.

Якісне визначення присутності антибіотика (CZO) в усіх елементах експериментальної системи здійснювали за допомогою дискодифузійного методу (табл. 1, рис. 1). Антибактеріальний ефект відносно сенсорної культури *S. aureus* було виявлено в усіх відібраних зразках, про що свідчили діаметри зон затримки росту сенсорної культури. Проте, потрібно зазначити, що достовірно ($p < 0,05$) найбільшими були діаметри зон затримки росту використаного для на-

Таблиця 1 – Протимікробна активність елементів фібринового згустка, насиченого цефазоліном (діаметри зон пригнічення росту сенсорної культури *S. aureus*, мм)

Досліджені зразки		Розрахована концентрація CZO у зразках, мкг/мл	Розведення зразків		
			Не розведений	1:10	1:100
Контроль антибіотика	CZO	250	40.19±0.37	34.15±0.51	28.06±0.45
Контроль 7,2 мл крові + 0,8 мл ізотонічного розчину	Сироватка	0	0	0	0
	Сироватка із згустка		0	0	0
	Відтиснутий тромб		0	NT	NT
7,8 мл крові + 0,2 мл CZO	Сироватка	6,25 (розведення 1:40)	34.70±0.79 ^{*/†}	26.23±0.28 ^{*/†}	18.61±0.26 ^{*/†}
	Сироватка із згустка		31.48±0.31 ^{*/†}	23.98±0.49 ^{*/†}	16.72±0.11 ^{*/†}
	Відтиснутий тромб		46.71±1.53 ^{*/†}	NT	NT
7,6 мл крові + 0,4 мл CZO (розведення CZO 1:20)	Сироватка	12,5 (розведення 1:20)	29.97±0.34 ^{*/†}	26.12±0.27 ^{*/†}	17.16±0.22 ^{*/†}
	Сироватка із згустка		29.14±0.25 ^{*/†}	25.39±0.28 ^{*/†}	16.34±0.17 ^{*/†}
	Відтиснутий тромб		44.53±0.52 ^{*/†}	NT	NT
7,4 мл крові + 0,6 мл CZO	Сироватка	18,75 (розведення 1:13)	28.02±0.26 ^{*/†}	22.83±0.43 ^{*/†}	18.06±0.42 ^{*/†}
	Сироватка із згустка		32.10±0.27 ^{*/†}	23.67±0.32 ^{*/†}	18.16±0.35 ^{*/†}
	Відтиснутий тромб		41.09±0.48 [†]	NT	NT
7,2 мл крові + 0,8 мл CZO	Сироватка	25 (розведення 1:10)	29.62±0.17 ^{*/†}	25.06±0.19 ^{*/†}	17.56±0.23 ^{*/†}
	Сироватка із згустка		29.98±0.25 ^{*/†}	22.43±0.32 ^{*/†}	16.63±0.26 ^{*/†}
	Відтиснутий тромб		39.27±0.40 [†]	NT	NT

Примітки: NT – спресований згусток тестували у цільній формі, без розведень; * – $p < 0,05$ при порівнянні з контрольним розчином CZO; † – $p < 0,05$ при порівнянні з контролем без антибіотика.

сичення розчину цефазоліну, у порівнянні зі зразками сироватки, отриманої з відтиснутого фібринового скаффолду та при природній ретракції тромбу. Отриманий нами результат відображає рівномірний розподіл антибіотика у різних фракціях крові, використаної для утворення PRF. Аналогічну картину спостерігали при тестуванні зразків, розведених в 10 і 100 разів. Зафіксовано закономірне зменшення відповідних діаметрів зон затримки росту сенсорної культури *S. aureus* пропорційно до ступеню розведення зразків сироваток.

Дослідження показало також присутність цефазоліну в мембранній формі PRF. Оскільки для тестування у кожному досліді було використано весь відпресований фібриновий згусток, діаметри зон затримки росту сенсорної культури в окремих випадках навіть перевищували контрольні значення, одержані для розчину антибіотика. Варто зауважити, що додавання в експериментальну систему більших доз розчину цефазоліну (0,6 мл на 7,4 мл крові і 0,8 мл на 7,2 мл крові) призвело до погіршення механічних властивостей сформованого згустка: утворювався дуже ніжний фібриновий каркас, який був механічно нестабільним і погано піддавався пресуванню.

Таким чином, серія попередніх досліджень показала присутність антибіотика (CZO) в усіх елементах експериментальної системи – і у відтиснутій із фібринового згустка сироватці, і в мембранній формі PRF. Однак дослідження дисконфузійним методом є лише якісним. Воно не дозволяє точно встановити концентрацію антибіотика в досліджуваному зразку і зробити остаточний висновок про його розподіл між окремими елементами експериментальної системи.

Тому метою наступного етапу роботи стало кількісне визначення вмісту антибіотиків у експериментальних зразках PRF. Для цього застосовано більш точний і чутливий метод серійних розведень. З метою виключення можливого впливу сироваткових факторів на ріст сенсорної культури *S. aureus* було виконано серію контрольних дослідів із сироваткою крові без антибіотика. Аналіз кривих росту, побудованих

на основі реєстрації оптичної щільності середовища в режимі реального часу (через кожну годину впродовж 24 год.), показав відсутність істотного впливу інтактної сироватки крові у відповідних концентраціях на інтенсивність росту сенсорної культури.

Експерименти з насиченням фібринового згустка проведено із трьома протимікробними препаратами – цефазоліном, лінкоміцином і ципрофлоксацином. Використаний в якості сенсорної культури штам *S. aureus* характеризується високою чутливістю до цих антибіотиків: MIC цефазоліну – 0,305 мкг/мл, MIC лінкоміцину – 5,86 мкг/мл, MIC ципрофлоксацину – 0,156 мкг/мл. З метою отримання достовірних статистичних даних значень тестування розведень кожного зразка проводили паралельно у трьох планшетах, після чого вираховували середні значення OD для кожного розведення. Індивідуальні значення OD в паралельних лунках планшетів використовували для проведення дисперсійного аналізу. Приймаючи до уваги реальне значення MIC антибіотика для сенсорної культури і ступінь розведення досліджуваного зразка, який давав аналогічні характеристики росту сенсорної культури, за середніми значеннями OD обчислювали концентрацію антибіотика у зразку. Результати виконаного тестування окремих елементів фібринових згустків наведено в **табл. 2**.

В експериментах по насиченню PRF цефазоліном при додаванні до 7,8 мл крові 0,2 мл розчину цефазоліну 250 мг/мл процес інкорпорації антибіотика у фібриново-тромбоцитарний матрикс відбувався слабо. У сироватці, відпресованій із згустка його концентрація була вдвічі, а в елюаті пресованого згустка – в 4 рази меншою, ніж у ретрагованій сироватці ($p < 0,05$). Цефазолін взагалі проявив слабку здатність до інкорпорації в білкову структуру фібриново-тромбоцитарного матриксу. При збільшенні дози антибіотика в експериментальній системі (до 0,4 мл / 7,6 мл крові і 0,8 мл / 7,2 мл крові) його концентрація в елюаті пресованого згустка залишалася вдвічі меншою, ніж у ретрагованій сироватці ($p < 0,05$). Лише в експерименті з 0,6 мл цефазоліну / 7,4 мл крові спо-

стерігали його рівномірний розподіл між усіма елементами системи.

На відміну від цефазоліну, лінкоміцин значно активніше насичував фібриново-тромбоцитарний згусток. Рівномірний його розподіл між усіма елементами експериментальної системи спостерігали лише при мінімальній дозі насичення (0,2 мл розчину лінкоміцину 300 мг/мл / 7,8 мл крові). При застосуванні для насичення більших доз (0,4-0,8 мл) лінкоміцину спостерігали його активну інкорпорацію в структуру PRF. При цьому основна кількість антибіотика локалізувалася у рідкій фазі, яка наповнювала фібрино-

вий каркас. Про це свідчить двократне збільшення концентрації лінкоміцину у відтиснутій із згустка сироватці, порівняно із сироваткою, яка утворилася в процесі його природної ретракції ($p < 0,05$). При застосуванні 0,8 мл розчину лінкоміцину для насичення 7,2 мл крові відбувалася максимальна інкорпорація антибіотика у білковий фібриновий каркас згустка. Було встановлено, що його концентрація в елюаті відтиснутого згустка вдвічі більша, ніж у відпресованій із нього сироватці.

Концентрація ципрофлоксацину в елюатах відтиснутих згустків при усіх варіантах постановки експери-

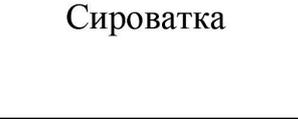
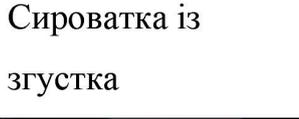
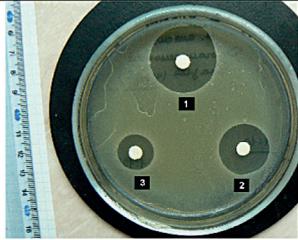
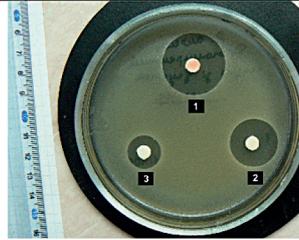
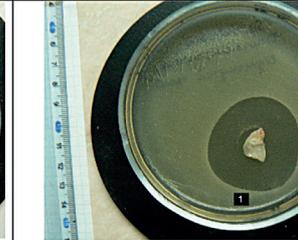
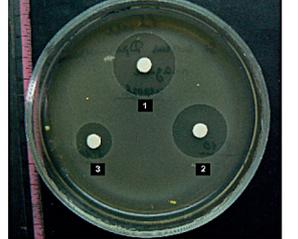
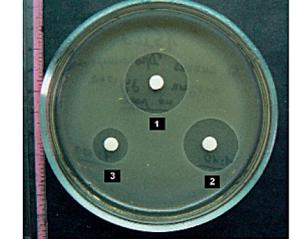
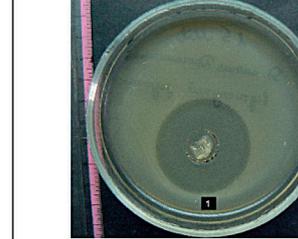
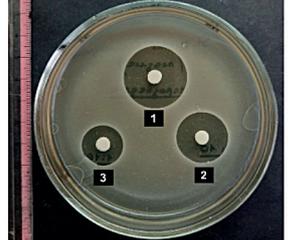
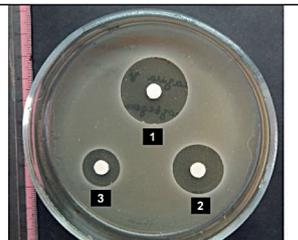
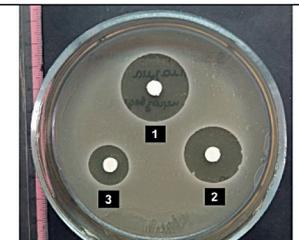
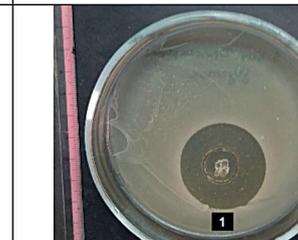
	Сироватка	Сироватка із згустка	Відтиснутий тромб
Контроль, CZO, 250 МКГ/МЛ			
7,8 мл крові + 0,2 мл CZO			
7,6 мл крові + 0,4 мл CZO			
7,4 мл крові + 0,6 мл CZO			
7,2 мл крові + 0,8 мл CZO			

Рисунок 1 – Пригнічення росту сенсорної культури *S. aureus* елементами фібринового згустка, насиченого цефазоліном (1 – не розведений зразок; 2 – розведення 1:10; 3 – розведення 1:100).

Таблиця 2 – Концентрація антибіотиків в елементах фібринових згустків при використанні різних режимів насичення

Склад експериментальної системи		Розрахована концентрація антибіотика в системі, мг/мл	Встановлена концентрація антибіотика, мг/мл		
Антибіотик	Кров		Сироватка після ретракції згустка	Сироватка, відпресована із згустка	Пресований згусток
Цефазолін, 250 мг/мл					
0.2 ml	7.8 ml	6.25	3.91	1.95*	0.49*
0.4 ml	7.6 ml	12.5	3.91	7.81*	1.95*
0.6 ml	7.4 ml	18.75	15.63	15.63	15.63
0.8 ml	7.2 ml	25.0	7.81	15.63	3.91*
Лінкоміцин, 300 мг/мл					
0.2 ml	7.8 ml	7.5	4.7	4.7	4.7
0.4 ml	7.6 ml	15.0	9.4	18.75*	9.4
0.6 ml	7.4 ml	22.5	9.4	18.75*	4.7*
0.8 ml	7.2 ml	30.0	18.75	9.4*	18.75
Ципрофлоксацин, 2,0 мг/мл					
0.2 ml	7.8 ml	50	0.0625	0.0156*	0.0039*
0.4 ml	7.6 ml	100	0.125	0.0625*	0.0039*
0.6 ml	7.4 ml	150	0.125	0.0625*	0.0156*
0.8 ml	7.2 ml	200	0.125	0.250*	0.03125*

Примітки: 1 – концентрації антибіотиків розраховані на основі середніх значень оптичної щільності культур, одержаних при виконанні 3 незалежних експериментів; 2 – $p < 0,05$ при порівнянні з концентрацією антибіотика в сироватці, одержаній після природної ретракції згустка впродовж 15 хв. його формування.

менту була в 4-16 разів меншою, на відміну від зразків відпресованих сироваток та в 4-32 рази меншою, ніж у ретрагованих сироваток ($p < 0,05$). Вказаний факт свідчив про несхильність до інкорпорації у білковий каркас PRF.

Характер відносного розподілу антибіотиків між елементами експериментальних систем наглядно демонструють діаграми, представлені на рис. 2. В процесі насичення PRF цефазоліном (рис. 2A) і лінкоміцином (рис. 2B) у згусток потрапляє близько 70% введеного у систему антибіотика. Виняток становить застосування мінімальної дози насичення цефазоліну (0,2 мл розчину / 7,8 мл крові), коли у згусток інкорпорує лише близько 40% антибіотика. Значно гірше відбувається насичення PRF ципрофлоксацином (рис. 2C).

В результаті насичення антибіотиками PRF значна частина препаратів перебуває у рідкій фазі, яка утримується білковим фібриновим каркасом. Безпосередньо у білковий каркас інкорпорує менша частка усіх препаратів. Порівняно найслабшу здатність до інкорпорації в PRF, і особливо у його фібриновий каркас, виявляє ципрофлоксацин. При аналізі отри-

маних фібринових матриксів нами також відмічено суттєве зниження їхніх механічних властивостей при додаванні в експериментальну систему високих доз розчинів антибіотиків (0,8 мл / 7,2 мл крові). Це призвело до утворення механічно нестабільного фібринового каркасу. Нами встановлено, що оптимальними режимами насичення є 0,4 мл або 0,6 мл розчину антибіотика і 7,6 мл або 7,4 мл крові відповідно. При таких режимах вдається досягнути оптимальної інкорпорації усіх тестованих препаратів у структуру PRF без негативного впливу на фізичні властивості згустка.

Враховуючи результати проведених мікробіологічних досліджень, а саме, характер розподілення антибіотиків у фракціях крові та негативний вплив великих доз їхніх розчинів на механічну стабільність фібринового скаффолду, для визначення впливу даних антибіотиків на концентрацію факторів росту оптимальна доза цих препаратів, які вводились в пробірку, становила не більше 0,4 мл / 7,6 мл крові.

Як видно з наведених даних у таблиці 3, не відмічалась різниця концентрації факторів росту між фракціями плазми з інкорпорованим антибіотиком

Таблиця 3 – Концентрація факторів росту у плазмі крові при додаванні антибіотиків

Фракції крові	VEGF-A pg/ml З додаванням антибіотика	PDGF-AA pg/ml З додаванням антибіотика	VEGF-A pg/ml Контроль	PDGF-AA pg/ml Контроль
L-PRF	47.72±8.62 [†]	92.05±0.39 [†]	48.96±9.69 [†]	91.37±0.57 [†]
A-PRF	58.18±15.13 [†]	89.99±1.37 [†]	67.19±14.14 [†]	84.63±4.51 [†]
I-PRF	99.02±24.24	75.60±5.67 [†]	117.95±26.69 [†]	71.51±6.29 [†]
Sticky bone	94.66±13.78 [†]	62.07±6.26 [†]	97.16±13.00 [†]	65.17±4.55 [†]
Experimental A	96.20±7.81 [†]	86.68±3.41 [†]	109.22±13.35 [†]	86.64±3.65
Experimental B	135.08±46.20	80.14±4.21 [†]	165.14±42.06 [†]	78.35±4.44 [†]

Примітки: * – $p < 0,05$ при порівнянні з контролем; [†] – $p < 0,05$ при порівнянні між фракціями крові.

та контрольними показниками, натомість, була достовірна відмінність між різними фракціями плазми отриманими при різних режимах центрифугування. Так, зокрема, при інкорпорації антибіотиками достовірно вища концентрація VEGF-A фактору відмічалась у методиках Sticky bone та Experimental A у порівнянні з L-PRF та A-PRF концентратами. Натомість, в інкорпорованих антибіотиками фракціях плазми концентрація PDGF-AA фактору

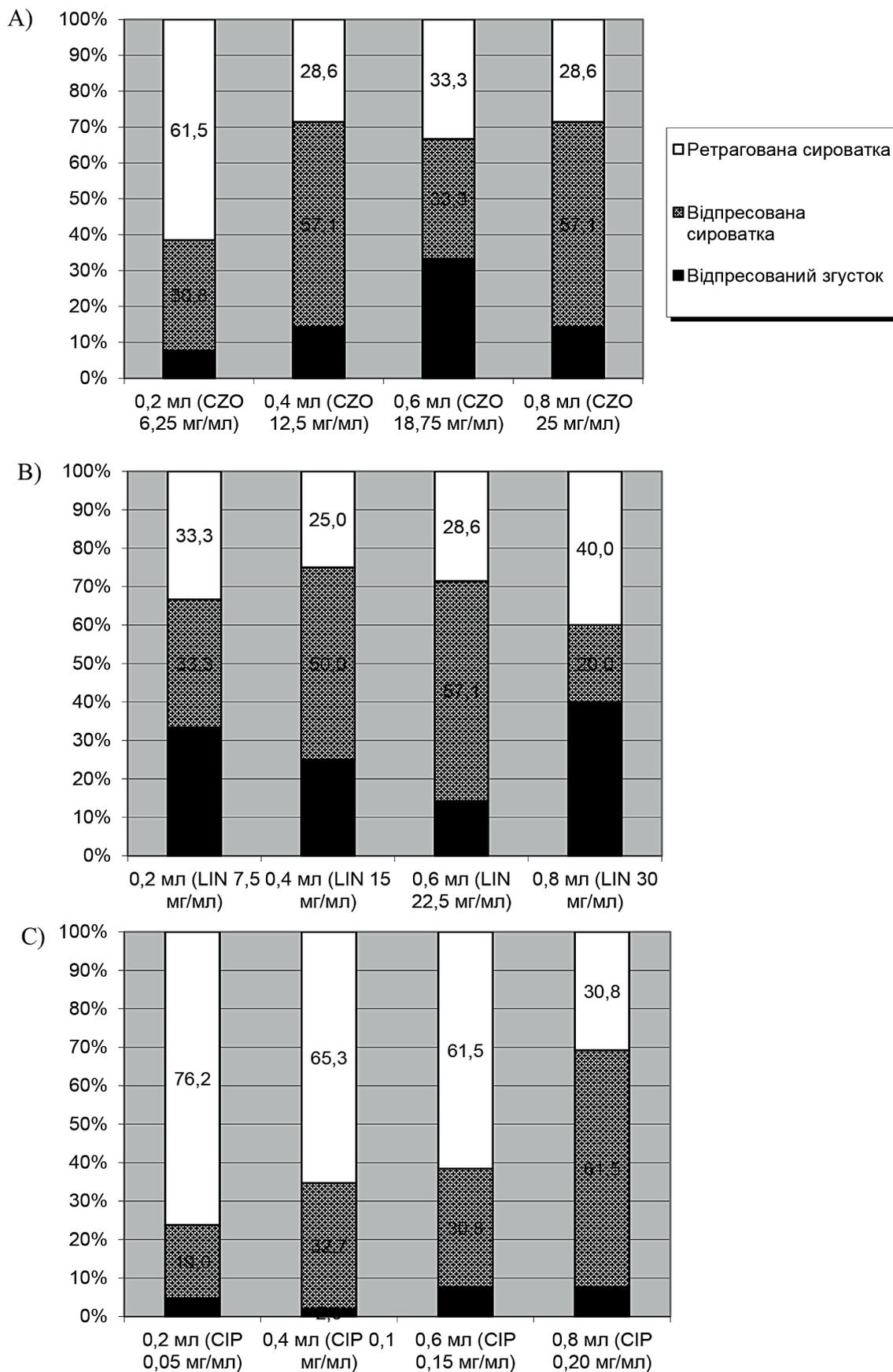


Рисунок 2 – Відносний розподіл цефазоліну (А), лінкоміцину (В) і ципрофлоксацину (С) між елементами PRF при використанні різних режимів насичення.

була достовірно вищою у L-PRF, A-PRF, Experimental A та Experimental B у порівнянні з I-PRF та Sticky bone. Порівняльний аналіз між лінкоміцином, цефазоліном та ципрофлоксацином показав достовірне зниження концентрації факторів росту у пробах з цефазоліном. Так, у пробах з цефазоліном концентрація VEGF-A фактору складала $43,37 \pm 7,44$ pg/ml, що достовірно $p < 0,001$ було нижчим від концентрації з лінкоміцином $157,50 \pm 26,95$ pg/ml та достовірно $p < 0,05$ меншим з ципрофлоксацином $108,72 \pm 24,23$ pg/ml. Аналогічна тенденція відмічалась при аналізі PDGF-AA, де концентрація даного фактору при додаванні цефазоліну складала $80,57 \pm 5,41$ pg/ml, що було достовірно $p < 0,05$ меншим від лінкоміцину $92,23 \pm 0,39$ pg/ml та меншим за ципрофлоксацин $91,38 \pm 0,65$ pg/ml.

Аналіз впливу антибактеріальних препаратів на формування фібринового скаффолду також проводили Polak D, Clemer-Shamai N, Sharira L, які довели, що у великих концентраціях антибіотики можуть негативно впливати на формування структури фібринового каркасу. Проте невеликі до 0,5 мл концентрації таких препаратів суттєво не впливали на PRF [23]. Виходячи із проведених авторами досліджень та порівнюючи з нашими спостереженнями можна зазначити, що оптимальною концентрацією антибіотика для імпрегнації фібрино-кісткових скаффолдів є кількість до 0,4 мл лінкоміцину. На доцільність малих концентрацій препарату також наголошували і Shaochuan Wang, Youbin Li [24]. Так, автори підтвердили, що завантажені у збагачену тромбоцитами плазму антибіотики можуть знижувати концентрацію фактора росту, що вивільняється з PRP, та порушувати структуру фібринового матриксу в залежності від концентрації завантаженого антибіотика. Було підтверджено, що нижча доза антибіотиків зберігала свій антимікробний ефект, не впливаючи на фактори росту, що вивільняються та не змінюючи структуру

фібринової мережі. Аналіз результатів попередніх досліджень також вказував на виражений протимікробний ефект у колагенових та полімерних мікроволоконистих скаффолдах [29]. Так, в експерименті по інкорпорації антибіотика у вказані каркаси цефазолін виявився найбільш стабільним протягом довгого періоду. Проте, у порівнянні із фібриновим матриксом полімерний каркас з механічної точки зору виявився менш чутливим до впливу антибіотиків. Отже, застосовані нами концентрації антибіотиків є цілком достатніми для забезпечення протимікробного ефекту при умові відсутності у мікроорганізмів резистентності до цих препаратів.

Висновки.

1. На відміну від цефазоліну, лінкоміцин значно активніше насичував фібриново-тромбоцитарний згусток. Рівномірний його розподіл між усіма елементами експериментальної системи спостерігали лише при мінімальній дозі насичення (0,2 мл розчину лінкоміцину 300 мг/мл / 7,8 мл крові).

2. Порівняльний аналіз між антибіотиками показав достовірне зниження до $43,37 \pm 7,44$ pg/ml концентрації VEGF-A фактору та зниження до $80,57 \pm 5,41$ pg/ml концентрації PDGF-AA фактору при додаванні цефазоліну, що може свідчити про пригнічення синтезу чи руйнуванням даних сигнальних білків в процесі формування тромбоцитарних концентратів.

Перспективи подальших досліджень.

Отримані нами дослідження свідчать про ефективність утримування антибіотиків у фібринових скаффолдах. Визначення розподілення антибіотиків у різних фракціях крові під час центрифугування встановило підґрунтя для проведення подальших клінічних досліджень із визначення ефективності локального вивільнення препарату в рані. Також пріоритетним на нашу думку може бути і подальше вивчення механізму впливу різних груп антибіотиків на концентрацію факторів росту.

References / Література

1. Avetkov DS, Stavitskiy SA, Lokes KP, Yatsenko IV. Otsinka efektyvnosti auhmentatsiyi alveolyarnoho hrebnya na etapi pidhotovky do dentalnoyi implantatsiyi. *Visnyk problem biolohiyi i medytsyny*. 2016;1(131):240-2. [in Ukrainian].
2. Pavlenko AV, Dmitriyeva EA, Luzin VI. Gistologicheskoye stroyeniye regenerata pri zapolnenii kostnogo defekta materialami easygraft i trikaltsiyfosfatom. *Morfologiya*. 2011;5(2):49-54.
3. Pavlenko OV, Dmytriyeva YeO. Morfolohichni osnovy vyboru kistkovoplastychnykh materialiv u parodontolohiyi. *Morfologiya*. 2011;5(1):5-12. [in Ukrainian].
4. Berwig KH, Baldasso C, Dettmer A. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate) generated by *Alcaligenes latus* using lactose and whey after acid protein precipitation process. *Bioresour. Technol.* 2016;218:31-7.
5. Hapach LA, Vanderburgh JA, Miller JP, Reinhart-King CA. Manipulation of in vitro collagen matrix architecture for scaffolds of improved physiological relevance. *Physical Biology*. 2015;12(6):061002. DOI: [10.1088/1478-3975/12/6/061002](https://doi.org/10.1088/1478-3975/12/6/061002).
6. Soldatiuk VM, Rozhko MM, Pantus AV. Clinical-morphological substantiation of the fibrous matrix with biogel ceno bonem application for preservation of the alveolar process of the jaws after the teeth removal. *Georgian medical news*. 2022;9(330):74-80.
7. Crisci A, Lombardi D, Serra E, Lombardi G, Cardillo F, Crisci M. Standardized protocol proposed for clinical use of L-PRF and the use of L-PRF Wound Box®. *J Unexplored Med Data*. 2017;2:77-87. DOI: [10.20517/2572-8180.2017.17](https://doi.org/10.20517/2572-8180.2017.17).
8. Kubesch A, Barbeck M, Al-Maawi S, Orlowska A, Booms P, Sader R, et al. A low-speed centrifugation concept leads to cell accumulation and vascularization of solid platelet-rich fibrin: An experimental study in vivo. *Platelets*. 2019;30(3):329-340. DOI: [10.1080/09537104.2018.1445835](https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1445835).
9. Lee HM, Shen EC, Shen JT, Fu E, Chiu HC, Hsia YJ. Tensile strength, growth factor content and proliferation activities for two platelet concentrates of platelet-rich fibrin and concentrated growth factor. *J. Dent. Sci.* 2020;15(2):141-146. DOI: [10.1016/j.jds.2020.03.011](https://doi.org/10.1016/j.jds.2020.03.011).
10. Li W, Sigley J, Pieters M, Helms C, Nagaswami C, Weisel JW, et al. Fibrin Fiber Stiffness Is Strongly Affected by Fiber Diameter, but Not by Fibrinogen Glycation. *Biophys. J.* 2016;110(6):1400-1410. DOI: [10.1016/j.bpj.2016.02.021](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.02.021).
11. McLellan J, Plevin S. Temporal release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) in the horse: a comparative in vitro analysis. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. 2014;12(1):48-57.
12. Caymaz G, Uyanik O. Comparison of the effect of advanced platelet-rich fibrin and leukocyte- and platelet-rich fibrin on outcomes after removal of impacted mandibular third molar: A randomized split-mouth study. *Niger. J. Clin. Pract.* 2019;22(4):546-552. DOI: [10.4103/njcp.njcp_473_18](https://doi.org/10.4103/njcp.njcp_473_18).
13. Canellas JVDs, Medeiros PJD, Figueredo CMDs, Fischer RG, Ritto FG. Platelet-rich fibrin in oral surgical procedures: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2019;48(3):395-414. DOI: [10.1016/j.ijom.2018.07.007](https://doi.org/10.1016/j.ijom.2018.07.007).
14. Caruana A, Savina D, Macedo JP, Soares SC. From Platelet-Rich Plasma to Advanced Platelet-Rich Fibrin: Biological Achievements and Clinical Advances in Modern Surgery. *Eur. J. Dent.* 2019;13(2):280-286. DOI: [10.1055/s-0039-1696585](https://doi.org/10.1055/s-0039-1696585).

15. Crisci A, Manfredi S, Crisci M. Fibrinrich in Leukocyte- Platelets (L-PRF) and Injectable Fibrin Rich Platelets (I-PRF), two opportunity in regenerative surgery: Review of the sciences and literature. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS). 2019;18:66-79.
16. Choukroun J, Ghanaati S. Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients' own inflammatory cells, platelets and growth factors: The first introduction to the low speed centrifugation concept. Eur. J. Trauma Emerg. Surg. 2018;44(1):87-95. DOI: [10.1007/s00068-017-0767-9](https://doi.org/10.1007/s00068-017-0767-9).
17. Siawasch SAM, Andrade C, Castro AB, Teughels W, Temmerman A, Quirynen M. Impact of local and systemic antimicrobials on leukocyte- and platelet rich fibrin: an in vitro study. Scientific Reports. 2022;12(1):2710. DOI: [10.1038/s41598-022-06473-4](https://doi.org/10.1038/s41598-022-06473-4).
18. Crisci A, Barillaro MC, Lepore G, Cardillo F. L-PRF Membrane (FibrinRich in Platelets and Leukocytes) and Its Derivatives (A-PRF, i- PRF) are Help ful as a Basis of Stem Cells in Regenerative Injury Treatment: Trial Work on the Horse. International Blood Research & Reviews. 2019;10(2):1-14.
19. Crisci A, Benincasa G, Crisci M, Crisci F. Leukocyte Platelet-Rich Fibrin (L-PRF), a new biomembrane useful in tissue repair: basic science and literature review. Biointerface Research in Applied Chemistry. 2018;8(5):3635-43.
20. Kim BJ, Kwon TK, Baek HS, Hwang DS, Kim CH, Chung IK, et al. A comparative study of the effectiveness of sinus bone grafting with recombinant human bone morphogenetic protein 2-coated tricalcium phosphate and platelet-rich fibrin-mixed tricalcium phosphate in rabbits. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2012;113(5):583-92. DOI: [10.1016/j.oro.2011.04.029](https://doi.org/10.1016/j.oro.2011.04.029).
21. De Almeida NCPM, Dos Santos NBM, Completo AMG, De Oliveira FGV. Tensile strength assay comparing the resistance between two different autologous platelet concentrates (leucocyte-platelet rich fibrin versus advanced- plateletrichfibrin): A pilotstudy. Int. J. Implant Dent. 2021;7(1):1. DOI: [10.1186/s40729-020-00284-w](https://doi.org/10.1186/s40729-020-00284-w).
22. El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X, Al-Maawi S, Orłowska A, Dias A, et al. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet- rich fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). European Journal of Trauma and Emergency Surgery. 2019;45(3):467-79.
23. Polak D, Clemer-Shamai N, Shapira L. Incorporating antibiotics into platelet-rich fibrin: a novel antibiotics slow-release biological device. J Clin Periodontol. 2019;46:241-247. DOI: [10.1111/jcpe.13063](https://doi.org/10.1111/jcpe.13063).
24. Wang S, Li Y, Li S, Yang J, Tang R, Li X, et al. Platelet-rich plasma loaded with antibiotics as an affiliated treatment for infected bone defect by combining wound healing property and antibacterial activity. Platelets. 2021;32(4):479-491. DOI: [10.1080/09537104.2020.1759792](https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1759792).
25. Whitman WB, DeVos P, Dedysh S, et al. Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2015. 26 p.
26. Makevych N, Kutsyk R, Kurovets L. The effect of Ruta graveolens L. ethanolic extracts on skin isolates of staphylococci and propionibacterium acnes. Wiadomości Lekarskie. 2023;76(7):1642-1649. DOI: [10.36740/WLek202307119](https://doi.org/10.36740/WLek202307119).
27. Belanger CR, Hancock REW. Testing physiologically relevant conditions in minimal inhibitory concentration assays. Nat Protoc. 2021;16(8):3761-3774. DOI: [10.1038/s41596-021-00572-8](https://doi.org/10.1038/s41596-021-00572-8).
28. Salam MA, Al-Amin MY, Pawar JS, Akhter N, Lucy IB. Conventional methods and future trends in antimicrobial susceptibility testing. Saudi J Biol Sci. 2023;30(3):103582. DOI: [10.1016/j.sjbs.2023.103582](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103582).
29. Pantus AV, Rozhko MM, Kutsyk RV, Kozovyi RV, Melnichuk MV. Antimicrobial activity of impregnated antibiotic matrix materials for bone tissue defect reconstruction. Arch Balk Med Union. 2020;55(1):22-30. DOI: [10.31688/ABMU.2020.55.1.02](https://doi.org/10.31688/ABMU.2020.55.1.02).

ВИВЧЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ ТА ХАРАКТЕРУ РОЗПРІДІЛЕННЯ РІЗНИХ ГРУП АНТИБІОТИКІВ У ПЛАЗМІ КРОВІ ТА ОТРИМАНОМУ НАМИ ФІБРИНОВОМУ СКАФФОЛДІ

Євчук Ю. І., Пантус А. В., Куцик Р. В., Рожко М. М., Ярмошук І. Р., Бугерчук О. В., Ковальчук Н. Є.

Резюме. На сьогоднішній день важливу роль у реконструкції тканин відводять функціональним носіям для цих тканин чи клітин, а саме, матриці на основі біосумісних біодеградуємих матеріалів із вираженим локальним антибактеріальним ефектом.

Метою дослідження було вивчення особливості розподілу концентрації антибіотиків у різних фракціях крові і фібриновому матриксі та виявити можливий вплив їхніх концентрацій на механічну цілісність такого каркасу та на концентрацію в ньому факторів росту.

Щоб провести оцінку концентрації антибіотика у фібринових скаффолдах було вивчено його розподіл у різних фазах експериментальної системи. Проводили аналіз сироватки, яка утворилась через 15 хвилин після центрифугування, сироватки крові виділену після відтискування фібринового згустку та аналіз елюату відтиснутого фібринового згустку. З метою визначення впливу антибіотика на індуктивні властивості фібринового скаффолду ми визначали концентрації факторів росту VEGF-A (Vascular Endothelial Cell Growth Factor) та PDGF-AA (Platelet Derived Growth Factor) у фракціях отриманих на різних режимах центрифугування.

Результати проведеного експериментального мікробіологічного дослідження свідчили про те, що на відміну від цефазоліну, лінкоміцину значно активніше насичував фібриново-тромбоцитарний згусток. Рівномірний його розподіл між усіма елементами експериментальної системи спостерігали лише при мінімальній дозі насичення (0,2 мл розчину лінкоміцину 300 мг/мл / 7,8 мл крові). При застосуванні для насичення більших доз (0,4-0,8 мл) лінкоміцину спостерігали його активну інкорпорацію у фібриновий матрикс. Ципрофлоксацин, навпаки, продемонстрував свою нехильність до накопиченню у фібриновому каркасі, про що свідчили зниження до 4-16 разів його концентрацій в елюатах відтиснутих згустків, у порівнянні з відповідними зразками відпресованих сироваток. Також концентрація ципрофлоксацину була в 4-32 рази нижчою, ніж у ретрагованих сироватках ($p < 0,05$). При аналізі отриманих фібринових матриксів нами також відмічено суттєве зниження їхніх механічних властивостей при додаванні в експериментальну систему високих доз розчинів антибіотиків (0,8 мл / 7,2 мл крові). Це призвело до утворення механічно нестабільного фібринового каркасу. Порівняльний аналіз між лінкоміцином, цефазоліном та ципрофлоксацином показав достовірне зниження до $43,37 \pm 7,44$ pg/ml концентрації VEGF-A фактору та зниження до $80,57 \pm 5,41$ pg/ml концентрації PDGF-AA фактору саме при додаванні цефазоліну.

Отже, застосовані нами концентрації антибіотиків є цілком достатніми для забезпечення протимікробного ефекту при умові відсутності у мікроорганізмів резистентності до цих препаратів.

Ключові слова: кісткова тканина, регенерація тканини, мікробіологічне дослідження, протимікробний ефект, фібриновий матрикс, антибактеріальна терапія.

STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND DISTRIBUTION OF DIFFERENT GROUPS OF ANTIBIOTICS IN BLOOD PLASMA AND THE FIBRIN SCAFFOLD OBTAINED BY US

Yevchuk Yu. I., Pantus A. V., Kutsyk R. V., Rozhko M. M., Yarmoshuk I. R., Buherchuk O. V., Kovalchuk N. Ye.

Abstract. Today, an important role in tissue reconstruction is assigned to functional carriers for tissues or cells, namely matrices based on biocompatible biodegradable materials with a pronounced local antibacterial effect.

The aim of the study was to investigate the distribution characteristics of antibiotic concentrations in different blood fractions and the fibrin matrix, as well as to determine the possible influence of these concentrations on the mechanical integrity of such a scaffold and on the concentration of growth factors within it.

To assess the concentration of the antibiotic in fibrin scaffolds, its distribution in different phases of the experimental system was studied. We analysed serum obtained 15 minutes after centrifugation, serum separated after pressing the fibrin clot, and the eluate from the pressed fibrin clot. In order to determine the effect of the antibiotic on the inductive properties of the fibrin scaffold, we determined the concentrations of the growth factors VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor) and PDGF-AA (Platelet-Derived Growth Factor) in fractions obtained under different centrifugation modes.

The results of the experimental microbiological study indicated that, in contrast to cefazolin, lincomycin saturated the fibrin-platelet clot much more actively. Its uniform distribution among all elements of the experimental system was observed only at the minimum saturation dose (0.2 ml of lincomycin solution 300 mg/ml / 7.8 ml of blood). When higher doses (0.4-0.8 ml) of lincomycin were used for saturation, its active incorporation into the fibrin matrix was observed. Ciprofloxacin, on the contrary, demonstrated a low tendency to accumulate in the fibrin framework, as evidenced by a 4-16-fold decrease in its concentrations in eluates from squeezed clots compared with the corresponding samples of pressed sera. The concentration of ciprofloxacin was also 4-32 times lower than in retracted sera ($p < 0.05$). When analysing the obtained fibrin matrices, we also noted a significant decrease in their mechanical properties when high doses of antibiotic solutions (0.8 ml / 7.2 ml of blood) were added to the experimental system. This led to the formation of a mechanically unstable fibrin scaffold. A comparative analysis between lincomycin, cefazolin and ciprofloxacin showed a significant decrease to 43.37 ± 7.44 pg/ml in the concentration of VEGF-A and a decrease to 80.57 ± 5.41 pg/ml in the concentration of PDGF-AA specifically when cefazolin was added.

Therefore, the concentrations of antibiotics used in this study are sufficient to ensure an antimicrobial effect, provided that microorganisms are not resistant to these drugs.

Key words: bone tissue, tissue regeneration, microbiological research, antimicrobial effect, fibrin matrix, antibacterial therapy.

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

Yevchuk Yu. I.: <https://orcid.org/0009-0007-4741-7099>^{BD}Pantus A. V.: <https://orcid.org/0000-0002-5245-8836>^AKutsyk R. V.: <https://orcid.org/0000-0001-9408-9074>^BRozhko M. M.: <https://orcid.org/0000-0002-6876-2533>^FYarmoshuk I. R.: <https://orcid.org/0000-0003-2636-8770>^CBuherchuk O. V.: <https://orcid.org/0000-0002-7386-5625>^EKovalchuk N. Ye.: <https://orcid.org/0009-0006-3347-8723>^C

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

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

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Yevchuk Yuriy Ivanovych / Євчук Юрій Іванович

Ivano-Frankivsk National Medical University / Івано-Франківський національний медичний університет
Ukraine, 76000, Ivano-Frankivsk, 2 Halytska str. / Україна, 76000, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька 2

Tel.: +380509841820 / Тел.: +380509841820

E-mail: yraevchyk77@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.

This article is distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution (CC-BY) License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited © All authors, 2026 / Ця стаття розповсюджується на умовах ліцензії **Creative Commons Attribution (CC-BY)**, яка дозволяє необмежене використання, поширення та відтворення в будь-якому форматі за умови належного цитування оригінальної роботи © Всі автори, 2026

Received 06.11.2025 / Стаття надійшла 06.11.2025 року
Accepted 03.03.2026 / Стаття прийнята до друку 03.03.2026 року
Published 27.03.2026 / Опубліковано 27.03.2026 року