

УДК 579.861.2.083.13

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2025-3-5-13>

Оценка комбинированного *ex vivo* воздействия термоабляции и ванкомицина на рост культуры *Staphylococcus aureus*

Горохова А.В.¹, Насибов Т.Ф.¹, Муштоватова Л.С.¹, Бочкарева О.П.¹, Анисеня И.И.^{2,3}, Ситников П.К.^{2,3}, Бариев У.А.¹, Лешенкова А.В.¹, Рыжкова А.Ю.¹, Пахмурин Д.О.^{1,2}, Хлусов И.А.^{1,2}

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Томский государственный университет систем управления и радиоэлектроники (ТУСУР)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 40

³ Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии Томского национального исследовательского
медицинского центра (НМИЦ) Российской академии наук
Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

РЕЗЮМЕ

Цель. Изучить *ex vivo* влияние высокотемпературного воздействия (55–56 °C) в сочетании с ванкомицином на поведение культуры патогенного золотистого стафилококка (*S. aureus*).

Материалы и методы. Жидкую культуру метициллинрезистентного *S. aureus* (MRSA) штамм 43300 нагревали *ex vivo* (55–56 °C, 0–60 мин) с или без добавления ванкомицина (20 мкг/мл), затем инкубировали (37 °C, до 120 мин). В качестве контроля использовалась микробная взвесь (100 или 250 микробных тел на 1 мл изотонического хлорида натрия) при 37 °C. После экстремального воздействия культуры *S. aureus* высевали на плотную питательную среду, через 48 ч определяли выход колониеобразующих единиц (КОЕ) методом компьютерной морфометрии цифровых изображений бактериальных культур в чашках Петри. Для каждой экспериментальной подгруппы (контроль роста; термоабляция; антибиотик; термоабляция + антибиотик) проводили не менее трех повторений.

Результаты. Отработан временной интервал высокотемпературного воздействия для определения полулетальной дозы нагревания (LD50) в отношении жидкой микробной культуры, который составил 12,25 мин при плотности разведения 100 микробных тел/мл растворителя. При увеличении плотности бактериальной культуры до 250 микробных тел/мл растворителя 30 мин ее нагревания до 55–56 °C недостаточно для подавления роста MRSA на агаре. Ванкомицин в терапевтической дозе 20 мкг/мл не влияет на выход КОЕ использованного патогенного штамма 43300. В то же время комбинированное *ex vivo* воздействие термоабляции и антибиотика оказывает бактериостатический эффект на уровне 28% ($p < 0,001$) подавления роста бактерий на агаровой питательной среде.

Заключение. Выявлен бактериостатический эффект комбинированного применения высокотемпературного воздействия с ванкомицином, неэффективных по отдельности. Полученные результаты имеют практическую значимость для реконструктивной хирургии костной ткани, однако требуют проведения дополнительных исследований для уточнения механизмов обнаруженного феномена.

Ключевые слова: MRSA, жидкая культура, высокотемпературное воздействие, антибактериальная терапия, колониеобразующие единицы, бактериостатический эффект

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

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № FEWM-2024-0003).

✉ Хлусов Игорь Альбертович, khlusov63@mail.ru

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено комиссией IACUC СибГМУ (заключение № 1 от 03.04.2024).

Для цитирования: Горохова А.В., Насибов Т.Ф., Муштоватова Л.С., Бочкарева О.П., Анисеня И.И., Ситников П.К., Бариев У.А., Лешенкова А.В., Рыжкова А.Ю., Пахмурин Д.О., Хлусов И.А. Оценка комбинированного *ex vivo* воздействия термоабляции и ванкомицина на рост культуры *Staphylococcus aureus*. *Бюллетень сибирской медицины*. 2025;24(3):5–13. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2025-3-5-13>.

Estimation of combined *ex vivo* effect of thermal ablation and vancomycin on the growth of *Staphylococcus aureus* culture

Gorokhova A.V.¹, Nasibov T.F.¹, Mushtovatova L.S.¹, Bochkareva O.P.¹, Anisenya I.I.^{2,3}, Sitnikov P.K.^{2,3}, Bariev U.A.¹, Leshenkova A.V.¹, Ryzhkova A.Yu.¹, Pakhmurin D.O.^{1,2}, Khlusov I.A.^{1,2}

¹ Siberian State Medical University (SibSMU)

2 Moskovsky trakt, 634050 Tomsk, Russian Federation

² Tomsk State University of Control Systems and Radioelectronics (TUSUR)

40 Lenin Ave., 634050 Tomsk, Russian Federation

³ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (NRMC), Russian Academy of Sciences

5 Kooperativny St., 634009 Tomsk, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To study the *ex vivo* effect of high temperature exposure (55–56 °C) combined with vancomycin on culture behavior of pathogenic *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

Materials and methods. Liquid cultures of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strain 43300 were heated *ex vivo* at 55–56 °C for 0–60 min, either with or without vancomycin (20 µg/ml), followed by incubation at 37 °C up to 120 min. A control suspension (100 or 250 microbial cells per 1 ml of isotonic saline) was maintained at 37 °C. Then, cultures were seeded on solid agar medium, and colony-forming units (CFU) were calculated using computer morphometry after 48h growth. Each experimental subgroup (growth control, thermal ablation, antibiotic, and thermal ablation + antibiotic) included at least three replicates.

Results. A semi-lethal heat exposure time (LD50) of 12.25 min was determined for a liquid microbial culture at 100 cells/ml. When the density was increased to 250 cells/ml, 30 min thermal ablation (55–56 °C) was insufficient for MRSA growth suppression. Vancomycin (20 µg/ml) alone did not affect CFU output. However, combined heat and antibiotic treatment resulted in 28% bacteriostatic effect ($p < 0.001$) on agar medium.

Conclusion. The study revealed a bacteriostatic effect of combined use of high-temperature exposure with vancomycin, which were ineffective when used separately. The obtained results have practical significance for reconstructive surgery of bone tissue, but require additional studies to clarify the mechanisms of the discovered phenomenon.

Keywords: MRSA, liquid culture, high temperature exposure, antibacterial therapy, colony-forming units, bacteriostatic effect

Conflict of interest. The authors declare no obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project No. FEWM-2024-0003).

Compliance with the principles of ethics. The study was approved by the IACUC Committee of Siberian State Medical University (Minutes No. 1 dated April 3, 2024).

For citation: Gorokhova A.V., Nasibov T.F., Mushtovatova L.S., Bochkareva O.P., Anisenya I.I., Sitnikov P.K., Bariev U.A., Leshenkova A.V., Ryzhkova A.Yu., Pakhmurin D.O., Khlusov I.A. Estimation of combined *ex vivo* effect of thermal ablation and vancomycin on the growth of *Staphylococcus aureus* culture. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2025;24(3):5–13. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2025-3-5-13>.

ВВЕДЕНИЕ

Золотистый стафилококк (*S. aureus*) – наиболее частый патогенный микроорганизм в стационарах хирургического профиля. При заболеваниях, вызванных *S. aureus*, продолжительность госпитализации, стоимость лечения и летальность в 2 раза выше, чем при инфекциях, вызванных другими видами микроорганизмов. С начала XXI в. резко (с 1–40 (по разным данным) до 54%) увеличилась частота выделения из очагов воспаления метициллинрезистентных (синоним – оксациллинрезистентных) штаммов *S. aureus* (MRSA) [1].

Проблема лечения MRSA-ассоциированных инфекционных заболеваний привлекает огромное внимание во всем мире. По ключевому запросу «MRSA and treatment» база данных PubMed Национального института Здоровья США (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) показала 25 642 публикации за период с 1955 по 2024 г. Максимальное число статей пришлось на 2021 г. (1 596 результатов).

S. aureus, включая MRSA, являются основными возбудителями имплантат-ассоциированных инфекций (до 50–80%) [2–4], которые включают перипротезные инфекции [5, 6] и инфекции, связанные с переломами костей [7]. Согласно другим источникам, *S. aureus* и *P. aeruginosa* выделены в 60% клинических случаев всех имплантат-ассоциированных инфекций [8].

Ванкомицин (VMN) является одним из ведущих антибактериальных препаратов, применяемых в эксперименте и клинике для профилактики и фармакотерапии остеомиелитов, вызванных MRSA [9]. В основном штаммы MRSA высокочувствительны к VMN [1]. Тем не менее однократного введения VMN даже в высоких дозах (до 1 г) бывает недостаточно для подавления MRSA-обусловленной инфекции [10].

Гипертермия рассматривается как один из перспективных подходов в комбинированной терапии инфекций, вызванных MRSA [11]. Однако в базе PubMed обнаружено всего 69 связанных с темой публикаций, начиная с 2003 г. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=mrsa%20and%20hyperthermia&timeline=expanded>; дата запроса 21.10.2024). По запросу «MRSA and thermal ablation» выявлено всего три результата с 2016 г., относящихся к фотодинамической терапии (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=mrsa+and+thermal+ablation>; дата запроса 21.10.2024).

В связи с этим изучение *in vitro* влияния высокотемпературного воздействия (термоабляции при 55–56 °C) в сочетании с ванкомицином на поведение MRSA культуры представляет безусловную актуальность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Свежеприготовленный (согласно прилагаемой инструкции производителя) питательный агар для культивирования микроорганизмов (ПАКМ) (БТН-агар, ООО «Биотехинновация», Россия) в пластиковых чашках Петри с крышкой (ООО «МиниМед», Беларусь) диаметром 90 мм проверили на контроль стерильности среды путем термостатирования при 37 °C в течение 24 ч. Питательный агар для культивирования микроорганизмов показал отсутствие микробного пророста (стерильность).

Исходная культура MRSA (штамм 43300) получена из бактериологической лаборатории СибГМУ, имеющей санитарно-эпидемиологическое заключение (от 20.07.2015 № 70.ТС.06.000.М.000268.07.15) на манипуляции с возбудителями инфекционных заболеваний III–IV групп патогенности.

В пластиковых стерильных конических пробирках с крышкой объемом 15 мл (ООО «МиниМед», Беларусь) было проведено разведение исходной культуры MRSA с достижением концентрации бактерий 100 или 250 микробных тел в 1 мл стерильного 0,9%-го раствора хлорида натрия.

Общее нагревание микробной взвеси в пробирках проводили в двух термостатах электрическом сухо-воздушном ШС-80Н («СГ-терм», Россия), настроенных на требуемую температуру 37 или 55–56 °C. Время экспозиции было выбрано на основании определения полуживого времени нагрева жидкой культуры MRSA в предварительном эксперименте.

После окончания нагрева жидких культур MRSA по 0,2 мл (20 или 50 микробных тел) взвеси бактерий переносили на ПАКМ в чашках Петри. Для каждой экспериментальной подгруппы (контроль роста при 37 °C; термоабляция при 55–56 °C; антибиотик при 37 °C; термоабляция при 55–56 °C + антибиотик ванкомицин (VMN, «Белмедпрепараты», Беларусь) 20 мкг/мл) использовали не менее трех пробирок/чашек Петри с культурой стафилококка.

Агаровые культуры MRSA на чашках Петри показали рост колониеобразующих единиц (КОЕ) уже через 24 ч культивирования при 37 °C и 100%-й влажности. Однако мелкие (пылевидные) КОЕ затрудняли проведение морфометрических исследований. Поэтому микробные культуры оставили расти еще 24 ч (общее время культивирования 48 ч), после чего оценивали потенциальный бактериостатический эффект по уменьшению площади КОЕ, выросших на ПАКМ.

Относительную площадь бактериальных культур оценивали согласно методу компьютерной морфометрии цифровых изображений [12]

с применением инструментов программы ImageJ, v. 1.38 (Национальный институт здоровья, США; <http://www.rsbi.info.nih.gov/ij/>). Цифровые фотографии получали с помощью фотоаппарата Canon PowerShot A2200 (Canon Inc., КНР) с разрешением 14,1 мегапикселей.

В связи с массивным, но не равномерным ростом MRSA на твердой питательной среде (агаре), для более точного подсчета относительной (удельной) площади (ОП) бактериальной культуры использовали следующую методику:

Каждую чашку Петри условно делили на восемь сегментов (рис. 1). В каждом сегменте подсчитывали площадь бактериальных культур (S_c) в квадратных миллиметрах. Подсчитывали площадь каждого сегмента (S_s) в квадратных миллиметрах. Рассчитывали относительную площадь бактериальных культур (S_r) для каждого сегмента по формуле $S_r = S_c/S_s$ и суммировали вычисленные доли.



Рис. 1. Примеры разделения чашки Петри на сегменты при подсчете площади выросших колоний MRSA

В результате вычислений получали ОП в чашке Петри, занимаемую бактериальными культурами.

Приготовленные жидкие взвеси MRSA в изотоническом растворе NaCl после перемешивания культивировали (с ванкомицином или без него) в следующем временном интервале (в основном экс-

перименте): 2 ч (120 мин) при 37 °C; 30 мин при 55–56 °C + 90 мин при 37 °C. Общий временной интервал (120 мин) предварительной инкубации жидких культур золотистого стафилококка был выбран в соответствии с предыдущими исследованиями [13], а также с учетом предварительного изучения популяционной дозы термоабляции при 55–56 °C.

Статистический анализ данных выполнялся в среде RStudio (v. 2024.04.2+764) на языке программирования R (v. 4.4.1) с использованием пакетов MVN [14], PMCMRplus [15], brunnermunzel [16]. Проверка количественных признаков на соответствие нормальному закону распределения выполнялась тестом Шапиро – Уилка (Shapiro – Wilk test) с поправкой Ройстона (Royston) AS R94 для больших выборок ($3 \leq n \leq 5\,000$) [17]. Описание количественных нормально распределенных признаков приводится в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$); количественных признаков, не соответствующих нормальному распределению и порядковых признаков, в виде медианы и первого и третьего квартилей $Me (Q_1; Q_3)$.

Для количественных, не согласующихся с нормальным законом независимых данных сравнение проводилось при помощи критерия Бруннера – Мюнцеля (Brunner – Munzel test) [18, 19]. Особенность критерия Бруннера – Мюнцеля состоит в том, он не нуждается в допущениях: (а) равные отклонения и (б) равные распределения, в то время как *U*-критерий Манна – Уитни (Mann – Whitney *U* test) достаточно чувствителен к их нарушениям, вместе с тем при выполнении указанных выше допущений критерий Бруннера – Мюнцеля соответствует *U*-критерию Манна – Уитни, что показывает его надежность и универсальность [20, 21].

Для количественных, не согласующихся с нормальным законом независимых данных, множественное сравнение проводилось при помощи критерия ван дер Вардена (Van der Waerden test). Выбор теста ван дер Вардена основывается на том, что он обеспечивает высокую мощность (на уровне ANOVA, при которой выполняются предположения о нормальности) [22], и вместе с тем обладает достаточной надежностью [23, 24]. В качестве апостериорного теста «один со всеми» («контроль со всеми») использовался критерий Данна (Dunn's post-hoc test).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Визуальная картина культивирования бактериальных КОЕ на твердой питательной среде (агаре) показала значительный ингибирующий эффект термоабляции на рост MRSA (рис. 2).

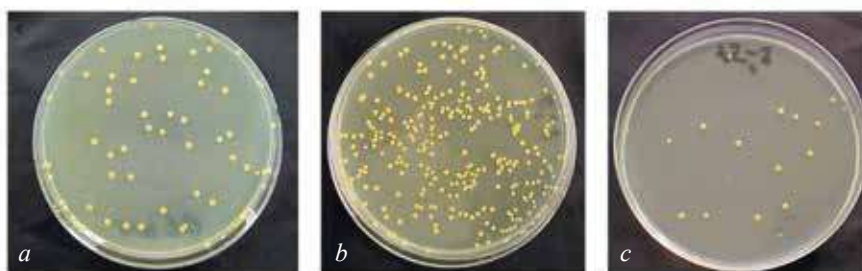


Рис. 2. Примеры 48-часового роста колоний MRSA на агаре в чашках Петри после предварительных экстремальных воздействий на жидкую бактериальную культуру (концентрация 100 микробных тел на 1 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия; 20 микробных тел на чашку Петри) при разных температурах: *a* – 37 °С, 120 мин; *b* – 37 °С, 120 мин; *c* – 55–56 °С 15 мин + 105 мин при 37 °С

Статистическая обработка результатов роста колоний MRSA на агаре после предварительного нагревания жидких микробных культур позволила установить, что при 55–56 °С статистически значимое падение площади КОЕ наблюдалось уже к 15-й мин экстремального воздействия (5,5% (11/198 мм²/чашку) от контроля); к 30-й мин рост MRSA колоний на агаре полностью отсутствовал (рис. 3).

Определение экспозиционной дозы тепловой энергии, вызывающей *in vitro* 50%-ю гибель КОЕ MRSA (LD50), проводилось по расчетным кривым с достоверной ($p < 0,001$) экспоненциальной (см. рис. 3) аппроксимацией данных. Расчетная LD50 при нагревании жидкой культуры MRSA (100 микробных тел на 1 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия) до 55–56 °С составила 12,25 мин (см. рис. 3).

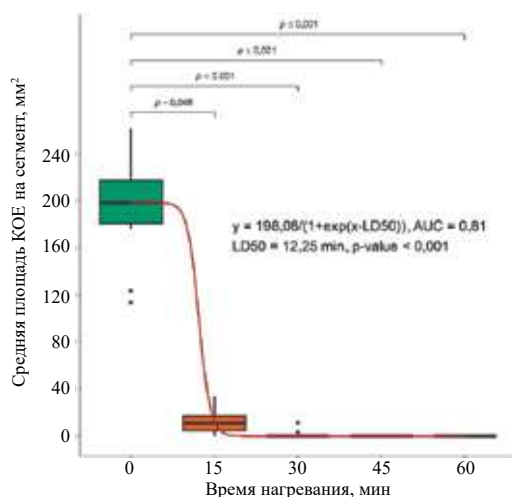


Рис. 3. Графическая аппроксимация экспериментальных данных по площади КОЕ (мм²), выросших в 48-часовой культуре MRSA на агаре после нагревания при 55–56 °С жидкой бактериальной культуры, для определения (по времени экстремального воздействия) экспозиционной полулетальной дозы (LD50) тепловой энергии. Здесь и на рис. 4, 7 результаты выражены как $Me (Q_1; Q_3)$. Множественное сравнение, критерий Ван дер Вердена ($p < 0,001$); попарные сравнения, критерий Данна ($p = 0,048$ между значениями точки 0 и точки 15 мин)

Таким образом, при концентрации MRSA в жидкой культуре 100 микробных тел на 1 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия нагревание до 55–56 °С быстро тормозит жизнедеятельность патогенных бактерий, что выражается в значительном бактериостатическом эффекте на твердой питательной среде (см. рис. 2, *c*). В то же время, когда при высевании MRSA на агаровую среду из 20 микробных тел, подвергнутых нагреванию в жидкой культуре, дают пророст только 11 КОЕ, возникает угроза ложноположительного результата при комбинированном ингибирующем воздействии термоабляции и антибиотика.

Кроме того, контрольная культура стафилококка при концентрации 100 микробных тел и температуре 37 °С дает нестабильный выход колониеобразующих единиц (см. рис. 2, *a, b*). В контрольных точках (0 мин термоабляции жидкой культуры; двухчасовая преинкубация бактерий в жидкой культуре и 48-часовой рост при 37 °С) при одинаковой плотности посева бактериальной культуры (20 микробных тел на чашку Петри) плотность роста КОЕ в контролях отличалась в 3,33 раза (площадь КОЕ 59,31 (20,47; 80,38) мм²/чашку (см. рис. 2, *a*) и 198,08 (180,85; 216,97) мм²/чашку, см. рис. 2, *b*).

В связи с перечисленными обстоятельствами основной эксперимент проводили на культуре MRSA с плотностью 250 микробных тел на 1 мл жидкой взвеси в 0,9%-м растворе NaCl, 50 микробных тел в 0,2 мл на агаровой среде чашек Петри. Время термоабляции жидких бактериальных культур при 55–56 °С составило 30 мин, что соответствует LD100 при плотности культуры 100 микробных тел на 1 мл хлорида натрия (см. рис. 3).

Однако был получен парадоксальный эффект стимуляции роста MRSA на агаре, поскольку после нагревания жидкой бактериальной взвеси доля выросших колоний, соответственно, увеличилась с 0,13 (13%) в контроле (37 °С) ($p < 0,001$; критерий Бруннера – Мюнзеля, рис. 4) до 0,22 (22% площади чашки Петри).

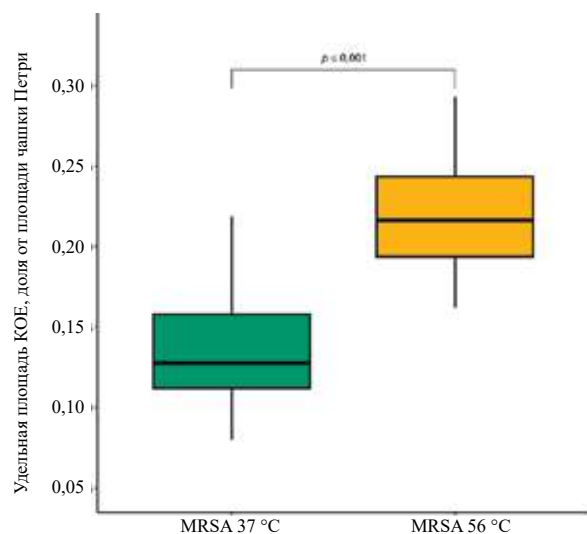


Рис. 4. Сравнение роста MRSA колоний на агаре в чашках Петри после предварительного нагревания жидких бактериальных культур до разных температур. Парное сравнение, критерий Бруннера – Мюнцеля

Возможно, имеет значение возросшая (со 100 до 250 микробных тел/мл) плотность микробной жидкой культуры, которая при гипертермии может приводить к увеличению выживаемости MRSA вследствие уменьшения величины поглощенного теплового потока (тепловой энергии на единицу площади поверхности микробных тел).

Интересно, что в VMN терапевтической концентрации (20 мкг/мл) в условиях двухчасового сокультивирования с жидкой культурой бактерий при температуре 37 °C не оказывал ингибирующего влияния на рост MRSA на агаре. Визуально число КОЕ не отличалось от такового в контрольной культуре (рис. 5).

Компьютерная морфометрия цифровых изображений КОЕ MRSA на агаре также не показала статистически значимых изменений после воздействия VMN на жидкую микробную культуру при 37 °C (таблица). Другими словами, использованная культура MRSA оказалась устойчивой к однократному двухчасовому воздействию VMN в дозе 20 мкг/мл при 37 °C в условиях.

В свою очередь, в условиях 30-минутного нагревания жидкой культуры бактерий при температуре 55–56 °C VMN в терапевтической концентрации (20 мкг/мл) визуально снижал число КОЕ, выросших на агаре, в сравнении с контрольной культурой (рис. 6).

Компьютерная морфометрия цифровых изображений показала статистически значимое ($p < 0,001$) снижение выхода КОЕ MRSA на агаре (на 28% в сравнении с контролем) после воздействия VMN на жидкую микробную культуру в условиях ее термоабляции при 55–56 °C (рис. 7).

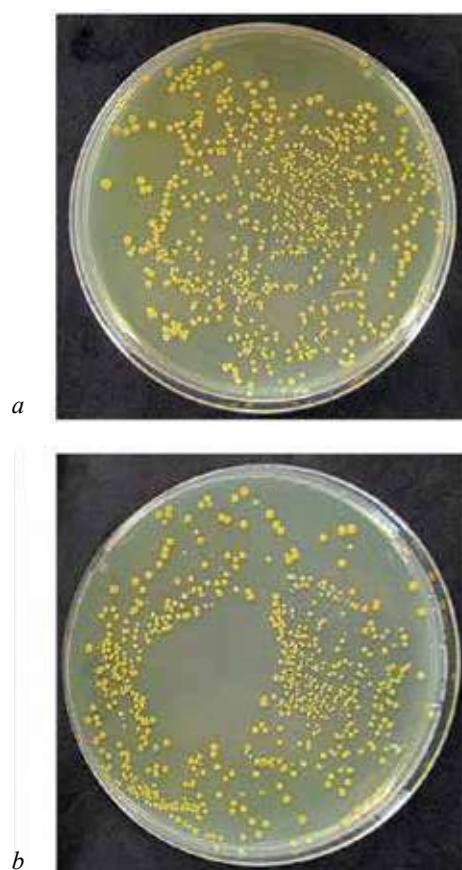


Рис. 5. Примеры 48-часового роста колоний MRSA на агаре в чашках Петри после двухчасового культивирования жидкой культуры при 37 °C с антибиотиком: *a* – контроль роста MRSA; *b* – RSA + VMN 20 мкг/мл

Таблица

Площадь (% от контроля) колониеобразующих единиц MRSA после экстремальных воздействий в жидкой культуре с последующим культивированием в течение 48 ч на агаре в чашках Петри при 37 °C			
Группа, $n = 3$	Объем выборки в каждой группе, n_1	Относительная площадь бактериальной культуры, $Me (Q_1; Q_3)$	Парное сравнение, критерий Бруннера – Мюнцеля
MRSA 37 °C, контроль роста	24	100,00 (87,58; 123,44)	5,13; $p = 0,16$
MRSA + VMN 37 °C	24	97,23 (81,95; 116,85)	

Примечание. VMN – ванкомицин, 20 мкг/мл; n – число чашек Петри в каждой группе, разбитых на восемь сегментов в каждой чашке (n_1) для более точного определения показателя.

Таким образом, нагрев жидких культур MRSA в течение 30 мин при температуре 55–56 °C достоверно увеличивает колониеобразующую способность MRSA на твердой питательной среде (агар-агар, см. рис. 4).

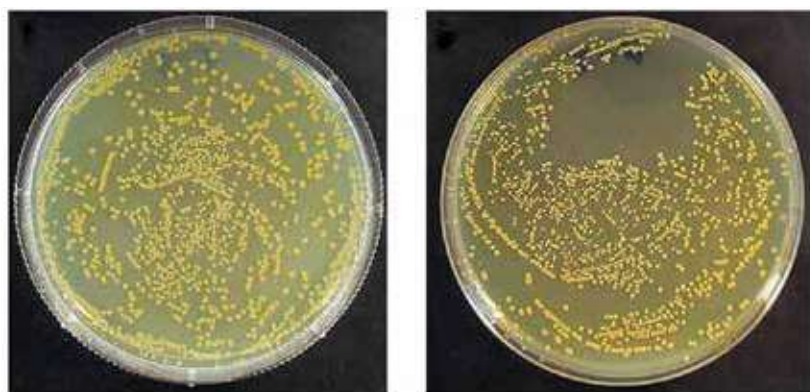


Рис. 6. Примеры 48-часового роста колоний MRSA на агаре в чашках Петри после предварительной термообработки жидкой культуры при 55–56 °С: *a* – контроль роста MRSA без антибиотика; *b* – MRSA + VMN 20 мкг/мл

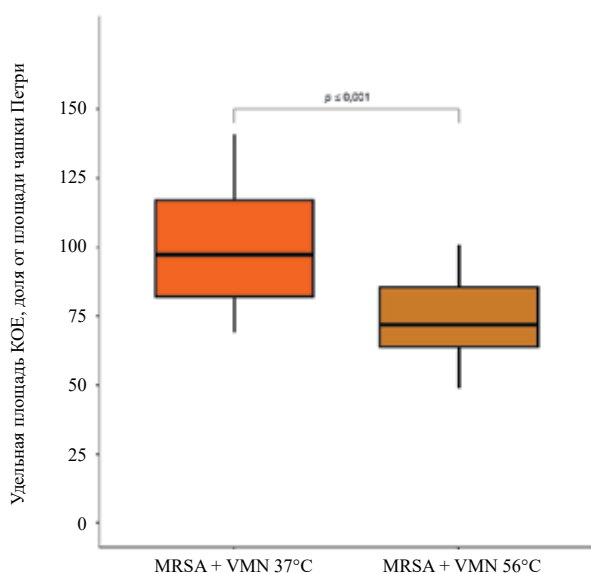


Рис. 7. Графическое изображение (% от контроля) площадей КОЕ MRSA после добавления ванкомицина (20 мкг/мл) и нагревания жидкой культуры при 37 или 55–56 °С с последующим культивированием в течение 48 ч на агаре в чашках Петри при 37 °С. Парное сравнение, критерий Бруннера – Мюнзеля

Введение в жидкую культуру ванкомицина (20 мкг/мл) без нагревания не влияет на выход микробных КОЕ на агаре (см. табл. 1). В свою очередь, нагревание микробной взвеси до температуры 55–56 °С (см. рис. 7) в присутствии VMN оказывает заметный бактериостатический эффект в сравнении с действием антибиотика при 37 °С. Предположительно, применение высокотемпературного воздействия (выше 55 °С) может улучшать результаты стандартной антибактериальной терапии в лечении и профилактики MRSA-индуцированного остеомиелита.

ОБСУЖДЕНИЕ

MRSA устойчивы к действию всех бета-лактамовых антибиотиков, включая ингибиторзащищенные пенициллины и цефалоспорины всех поколений.

Другой клинически важной особенностью метициллинрезистентных стафилококков является высокая частота ассоциированной устойчивости к антибактериальным препаратам разных групп (к аминогликозидам, макролидам и линкозамидам) [1]. В связи с высокой частотой использования антибиотиков в комплексном лечении хирургических больных для проведения экспериментов *in vitro* был выбран патогенный MRSA штамм 43300.

Ванкомицин в терапевтической концентрации в сыворотке крови человека в диапазоне 10–20 мкг/мл [25] является одним из ведущих антибактериальных препаратов, применяемых для профилактики и фармакотерапии остеомиелитов, вызванных MRSA [9].

Тем не менее использованный в работе MRSA штамм 43300 оказался нечувствительным к терапевтической дозе VMN (20 мкг/мл) при температуре 37 °С (см. табл. 1), соответствующей температуре тела человека, особенно в условиях воспалительных процессов. Неожиданным оказался усиленный выход бактериальных КОЕ при относительно высокой плотности микробной жидкой культуры (250 микробных тел на 1 мл) в условиях 30-минутного нагревания микробной взвеси до 55–56 °С, вызывающем, как правило, коагуляционный некроз (см. рис. 4).

Возможным объяснением полученного феномена служит тот факт, что возрастание генетического разнообразия с ростом числа микробных тел в культуре приводит к появлению и накоплению бактерий, несущих гены устойчивости к антибиотикам [26]. В свою очередь, это повышает в целом шансы бактериального штамма на выживание в экстремальных условиях. В частности, существует значительная вариативность термочувствительности *S. aureus* к 45 °С [27]. По аналогии с остеогенными клетками, которые активируются при умеренной гипертермии (~ 42 °С) за счет гиперэкспрессии белков теплового шока [28], часть «термотолерантных» MRSA могут обуславливать выживание штамма при высоких температурах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антибиотикотерапия считается золотым стандартом в профилактике и лечении инфекционных осложнений при переломах костей и их хирургическом лечении [7]. Однако нарастающая антибиотикорезистентность бактериальных штаммов и увеличение вклада MRSA в инфекционное воспаление делают разработку новых подходов к терапии инфекционных осложнений краеугольной задачей биомедицины.

В этом плане важным результатом проведенного *in vitro* исследования является практическая целесообразность одновременного назначения ванкомицина и термоабляции жидких культур MRSA, неэффективных по отдельности, но оказывающих практически 30 %-й бактериостатический эффект при их комбинированном использовании. Полученные данные имеют практическую значимость для специалистов, занимающихся лечением заболеваний костей скелета и их осложнений. Однако полученные результаты требуют проведения дополнительных исследований для уточнения механизмов обнаруженного феномена.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Наumenko З.С., Розова Л.В. Устойчивость *Staphylococcus aureus* к антибактериальным препаратам. *Гений ортопедии*. 2007;(2):36–38.
2. Божкова С.А., Тихилов Р.М., Краснова М.В., Рукина А.Н. Ортопедическая имплантат-ассоциированная инфекция: ведущие возбудители, локальная резистентность и рекомендации по антибактериальной терапии. *Травматология и ортопедия России*. 2013;19(4):5–15. DOI: 10.21823/2311-2905-2013--4-5-15.
3. Bozhkova S., Tikhilov R., Labutin D., Denisov A., Shubnyakov I., Razorenov V. et al. Failure of the first step of two-stage revision due to polymicrobial prosthetic joint infection of the hip. *Journal of Orthopaedics and Traumatology: Official Journal of the Italian Society of Orthopaedics and Traumatology*. 2016;17(4):369–376. DOI: 10.1007/s10195-016-0417-8.
4. Masters E.A., Ricciardi B.F., Bentley K.L. de M., Moriarty T.F., Schwarz E.M., Muthukrishnan G. Skeletal infections: microbial pathogenesis, immunity and clinical management. *Nature Reviews. Microbiology*. 2022;20(7):385–400. DOI: 10.1038/s41579-022-00686-0.
5. Parvizi J., Gehrke T. International consensus group on periprosthetic joint infection. Definition of periprosthetic joint infection. *The Journal of Arthroplasty*. 2014;29(7):1331. DOI: 10.1016/j.arth.2014.03.009.
6. Manning L., Allen B., Davis J.S. Design Characteristics and Recruitment Rates for Randomized Trials of Peri-Prosthetic Joint Infection Management: A Systematic Review. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 2023;12(10):1486. DOI: 10.3390/antibiotics12101486.
7. He S.Y., Yu B., Jiang N. Current concepts of fracture-related infection. *International Journal of Clinical Practice*. 2023;2023:4839701. DOI: 10.1155/2023/4839701.
8. Rahim M.I., Rohde M., Rais B., Seitz J.M., Mueller P.P. Susceptibility of metallic magnesium implants to bacterial biofilm infections. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. 2016;104(6):1489–1499. DOI: 10.1002/jbm.a.35680.
9. Rybak M.J., Lomaestro B.M., Rotschafer J.C., Moellering R.C., Craig W.A., Billeter M. et al. Therapeutic monitoring of vancomycin in adults summary of consensus recommendations from the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy*. 2009;29(11):1275–1279. DOI: 10.1592/phco.29.11.1275.
10. Bue M., Hanberg P., Koch J., Jensen L.K., Lunderorf M., Aalbaek B. et al. Single-dose bone pharmacokinetics of vancomycin in a porcine implant-associated osteomyelitis model. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 2018;36(4):1093–1098. DOI: 10.1002/jor.23776.
11. Palau M., Muñoz E., Larrosa N., Gomis X., Márquez E., Len O. et al. Hyperthermia prevents *in vitro* and *in vivo* biofilm formation on endotracheal tubes. *Microbiology Spectrum*. 2023;11(1):e0280722. DOI: 10.1128/spectrum.02807-22.
12. Шахов В.П., Хлусов И.А., Дамбаев Г.Ц., Зайцев К.В., Салмина (Егорова) А.Б., Шахова С.С. и др. Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей. Новосибирск: STT, 2004.
13. Prosolov K.A., Mitrichenko D.V., Prosolov A.B., Nikolayeva O.O., Lastovka V.V., Belyavskaya O.A. et al. Zn-doped CaP-based coatings on Ti–6Al–4V and Ti–6Al–7Nb alloys prepared by magnetron sputtering: controllable biodegradation, bacteriostatic, and osteogenic activities. *Coatings*. 2021;11(7):809. DOI: 10.3390/coatings11070809.
14. Korkmaz S., Göksülük D., Zararsiz G. MVN: An R package for assessing multivariate normality. *R JOURNAL*. 2014;6(2):151–162. DOI: 10.32614/RJ-2014-031.
15. Pohlert T. PMCMRplus: Calculate pairwise multiple comparisons of mean rank sums extended. 2018. DOI: 10.32614/CRAN.package.PMCMRplus.
16. Brunnermunzel package. RDocumentation. [Accessed 18th October 2024]. Available online: <https://www.rdocumentation.org/packages/brunnermunzel/versions/2.0>.
17. Royston P. Remark AS R94: a remark on algorithm AS 181: the W-test for normality. *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)*. 1995;44(4):547–551. DOI: 10.2307/2986146.
18. Munzel U., Brunner E. Nonparametric tests in the unbalanced multivariate one-way design. *Biometrical Journal*. 2000;42(7):837–854. DOI: 10.1002/1521-4036(200011)42:7<837::AID-BIMJ837>3.0.CO;2-S.
19. Brunner E., Munzel U. The nonparametric behrens-fisher problem: asymptotic theory and a small-sample approximation. *Biometrical Journal*. 2000;42(1):17–25. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4036(200001)42:1<17::AID-BIMJ17>3.0.CO;2-U.
20. Karch J.D. Psychologists should use Brunner-Munzel's instead of Mann-Whitney's U test as the default nonparametric procedure. *Advances in Methods and Practices in Psychological Science*. 2021;4. DOI: 10.1177/2515245921999602.
21. Noguchi K., Konietzschke F., Marmolejo-Ramos F., Pauly M. Permutation tests are robust and powerful at 0.5% and 5% significance levels. *Behavior Research Methods*.

- 2021;53(6):2712–2724. DOI: 10.3758/s13428-021-01595-5.
22. Elamir E. On uses of Van der Waerden test: a graphical approach. *Preprint arXiv*. 2022. DOI: 10.48550/arXiv.2203.02148.
23. Macunluoglu A.C., Ocakoğlu G. Comparison of the performances of non-parametric k-sample test procedures as an alternative to one-way analysis of variance. *The European Research Journal*. 2023;9(4) 687–696. DOI: 10.18621/eurj.1037546.
24. Luepsen H. Comparison of nonparametric analysis of variance methods: A vote for van der Waerden. *Communications in Statistics – Simulation and Computation*. 2018;47(9):2547. DOI: 10.1080/03610918.2017.1353613.
25. Hirano R., Sakamoto Y., Kitazawa J., Yamamoto S., Tachibana N. Pharmacist-managed dose adjustment feedback using therapeutic drug monitoring of vancomycin was useful for patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a single institution experience. *Infection and Drug Resistance*. 2016;9:243–252. DOI: 10.2147/IDR.S109485.
26. Lehtinen S., Blanquart F., Croucher N.J., Turner P., Lipsitch M., Fraser C. Evolution of antibiotic resistance is linked to any genetic mechanism affecting bacterial duration of carriage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(5):1075–1080. DOI: 10.1073/pnas.1617849114.
27. Sturtevant R.A., Sharma P., Pavlovsky L., Stewart E.J., Solomon M.J., Younger J.G. Thermal augmentation of vancomycin against staphylococcal biofilms. *Shock (Augusta, Ga.)*. 2015;44(2):121–127. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000369.
28. Zhao Y., Peng X., Xu X., Wu M., Sun F., Xin Q. et al. Chitosan based photothermal scaffold fighting against bone tumor-related complications: *Recurrence, infection, and defects*. *Carbohydrate Polymers*. 2023;300:120264. DOI: 10.1016/j.carbpol.2022.120264.

Вклад авторов

Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Горохова А.В. – морфометрическая обработка интерпретация и визуализация данных. Насибов Т.Ф. – написание и редактирование статьи, статистический анализ. Муштоватова Л.С. – разработка концепции и дизайна исследования, проведение экспериментального исследования. Бочкарева О.П., Бариев У.А. – проведение экспериментального исследования. Анисеня И.И., Ситников П.К. – проведение экспериментального исследования, интерпретация экспериментальных данных. Лешенкова А.В. – проведение экспериментального исследования, визуализация данных. Рыжкова А.Ю. – проведение экспериментального исследования, сбор и анализ литературных источников. Пахмурин Д.О. – окончательное утверждение содержания для публикации рукописи, проведение экспериментального исследования. Хлусов И.А. – координация выполнения исследования, написание и редактирование статьи.

Информация об авторах

Горохова Анна Владимировна – лаборант-исследователь, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск, a.gorokhova3062@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8401-7181>

Насибов Темур Фиррудин оглы – лаборант-исследователь, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск, temur.nsbv@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8056-3967>

Муштоватова Людмила Степановна – канд. биол. наук, доцент, доцент кафедры микробиологии и вирусологии, СибГМУ, г. Томск, mls2013@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4339-5204>

Бочкарева Ольга Петровна – канд. мед. наук, доцент, доцент кафедры микробиологии и вирусологии, СибГМУ, г. Томск, bpo97@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9063-0326>

Анисеня Илья Иванович – канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, отделение общей онкологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ; науч. сотрудник лаборатории «Медтех», ТУСУР, г. Томск, aii@mail.tsu.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3882-4665>

Ситников Павел Константинович – врач-онколог, отделение общей онкологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ; мл. науч. сотрудник, лаборатория «Медтех», ТУСУР, г. Томск, sitnikov.pavel.k@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0674-2067>

Бариев Усман Адамович – лаборант-исследователь, лаборатория клеточных и микрофлюидных технологий, СибГМУ, г. Томск, Bariev.Usman.20002@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0002-7547-2558>

Лешенкова Анастасия Владимировна – студентка, медико-биологический факультет, СибГМУ, г. Томск, nasya14.a@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0003-5358-9795>

Рыжкова Алина Юрьевна – студентка, медико-биологический факультет СибГМУ, г. Томск, alya.ryzhkova.20031@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7862-7992>

Пахмурин Денис Олегович – канд. техн. наук, доцент, зав. лабораторией «Медтех», ТУСУР; доцент кафедры медицинской и биологической кибернетики, СибГМУ, г. Томск, pdo@ie.tusur.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5191-6938>

Хлусов Игорь Альбертович – д-р мед. наук, профессор кафедры морфологии и общей патологии, руководитель лаборатории клеточных и микрофлюидных технологий, СибГМУ, г. Томск, khlov63@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3465-8452>

(✉) Хлусов Игорь Альбертович, khlov63@mail.ru

Поступила в редакцию 05.03.2025;
одобрена после рецензирования 14.03.2025;
принята к публикации 20.03.2025