

## Информационная характеристика микробных биопленок, формируемых *In vitro* на поверхности покровного стекла клиническими штаммами *Klebsiella pneumoniae*

Е.В. Осипова, И.В. Шипицына

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Курган, Россия

### Informational characteristics of microbial biofilms formed by clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* in vitro on the surface of the cover glass

E.V. Osipova, I.V. Shipitsyna

Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopaedics, Kurgan, Russian Federation

**Цель.** Получение количественных и информационных характеристик биопленок, формируемых клиническими штаммами *Klebsiella pneumoniae* *in vitro* на поверхности покровного стекла. **Материалы и методы.** Исследована способность к биопленкообразованию *in vitro* на поверхности покровного стекла клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в монокультуре (БЛРС+) ( $n = 3$ ) и в ассоциациях со *Staphylococcus aureus* ( $n = 6$ ) у 9 пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей из свищей в дооперационном периоде или из очага воспаления во время операции. **Результаты.** Монокультуры *K. pneumoniae* (БЛРС+) отличались более низкой адгезивной способностью по сравнению со штаммами *K. pneumoniae*, выделенными из ассоциаций со *S. aureus*. Самая высокая адгезивная активность на поверхности покровного стекла отмечена у смешанной культуры *K. pneumoniae* + *S. aureus*. Информационные характеристики зависели от вида формирующихся биопленок. Общим для биопленок было отсутствие изменений максимально возможного структурного разнообразия. Отмечены значимые различия между существующим структурным разнообразием биопленок, образованных монокультурами *K. pneumoniae*, выделенными из ассоциаций, и смешанной культурой *K. pneumoniae* + *S. aureus*. **Заключение.** Отсутствие выраженной вариабельности информационных показателей в ходе эксперимента в пределах каждого микробного сообщества свидетельствует о стремлении всех систем формирующихся биопленок к сохранению стабильности.

**Ключевые слова:** *Klebsiella pneumoniae*, биопленки, хронический остеомиелит, информационный анализ

**Purpose** Obtaining quantitative and informational characteristics of biofilms formed by clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* *in vitro* on the surface of a cover glass. **Materials and methods** *In vitro* biofilm formation on the surface of the cover glass was studied for clinical *Klebsiella pneumoniae* strains, isolated in a monoculture (ESBL+) ( $n = 3$ ) and in associations with *Staphylococcus aureus* ( $n = 6$ ) in 9 patients with chronic osteomyelitis of long bones harvested from fistulae in the preoperative period or from the infection focus during surgery. **Results** Monocultures of *K. pneumoniae* (BLRS+) differed by their lower adhesive ability when compared to strains of *K. pneumoniae* isolated from associations with *S. aureus*. The highest adhesive activity on the surface of the cover glass was observed in a mixed culture of *K. pneumoniae* + *S. aureus*. Informational characteristics depended on the type of biofilms formed. Common to biofilms was the absence of changes in the maximum possible structural diversity. Significant differences between the existing structural diversity of biofilms formed by monocultures of *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae* isolated from associations and a mixed culture of *K. pneumoniae* + *S. aureus* were noted. **Conclusion** The absence of pronounced variability of information indicators during the experiment within each microbial community indicates the tendency of all systems of emerging biofilms to preserve stability.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, biofilms, chronic osteomyelitis, information analysis

В патогенезе хронического остеомиелита большое значение уделяется роли бактериальных биопленок, оказывающих влияние на рецидивирующее течение заболевания, хронизацию воспалительного процесса и резистентность к антимикробным препаратам [1]. На долю *Klebsiella pneumoniae* в этиологической структуре данного заболевания приходится около 3 % [2]. Патогенность *K. pneumoniae* заключается в способности продуцировать бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), что привело к появлению штаммов с множественной лекарственной устойчивостью и, как следствие, включение данного патогена в группу микроорганизмов «ESKAPE» (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*) [3].

Так же, как и другие бактерии, *K. pneumoniae* может формировать биопленки на биотических и абиотических поверхностях. От 40 до 93,6 % клинических изолятов *K.*

*pneumoniae*, выделенных из мочи, крови, мокроты, ран, обладают способностью к биопленкообразованию *in vitro* [4, 5]. Имеются данные о более высокой способности к биопленкообразованию клинических изолятов с множественной лекарственной устойчивостью [6, 7]. Наибольшая биопленкообразующая способность характерна для штаммов, выделенных с поверхности кости [7].

К настоящему времени изучению биопленкообразования штаммами, выделенными из остеомиелитического очага, посвящены единичные работы, а исследований, посвященных изучению информационного состояния формирующихся биопленок, в доступной литературе не обнаружено, что и определяет актуальность данного исследования.

**Цель** нашего исследования – получение количественных и информационных характеристик биопленок, формируемых клиническими штаммами *Klebsiella pneumoniae* *in vitro* на поверхности покровного стекла.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали клинические штаммы *Klebsiella pneumoniae*, выделенные в монокультуре (БЛРС+) (n = 3) и в ассоциациях со *Staphylococcus aureus* (n = 6) у 9 пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей из свищей в дооперационном периоде или из очага воспаления во время операции.

Выделение и идентификацию исследуемых штаммов проводили общепринятыми методами.

**Получение бактериальных биопленок на поверхности покровного стекла.** В стерильную стеклянную чашку Петри диаметром 100 мм помещали стерильное покровное стекло размером 24 × 24 мм, на поверхность которого осторожно наливали 200 мкл суточной культуры штамма с концентрацией клеток  $5 \times 10^7$  КОЕ/мл, что соответствовало оптической плотности 0,2 по МакФарланд, с последующей инкубацией в термостате при 37 °С в течение 3-х часов. Затем добавляли мясопептонный бульон до 2 мл и вновь помещали в термостат при 37 °С на 24 и 48 часов. После инкубации питательную среду сливали, трижды промывали поверхность стекол 1,15М фосфатным буфером, фиксировали 96° этиловым спиртом, высушивали и окрашивали раствором генцианвиолета в течение 2 минут при комнатной температуре, после чего промывали фосфатным буфером.

Ассоциативную биопленку *K. pneumoniae* + *S. aureus* *in vitro* получали, смешивая суточные культуры штаммов в соотношении 1:1.

Для получения цифровых изображений полей зрения препаратов формирующейся биопленки и ее количественных характеристик использовали микроскоп Axio Lab.A1, модульное программное обеспечение ZEN («Carl Zeiss», Германия) и программу ImageJ (США).

На изображениях измеряли площадь поля зрения, количество и площадь, занимаемую одиночными адгезированными клетками и микроколониями. Определяли количество одиночных адгезированных клеток и микроколоний на единицу площади (1мм<sup>2</sup>) и доли, занимаемые ими в площади поля зрения, с учетом размера микроколоний: до 10 мкм<sup>2</sup>, от 10 до 100 мкм<sup>2</sup>, от 100 до 1000 мкм<sup>2</sup>, от 1000 до 10000 мкм<sup>2</sup>, > 10000 мкм<sup>2</sup>. С каждого препарата вводили не менее 20 случайных полей зрения, полученные результаты усредняли. Для оценки информационного состояния формирующейся биопленки рассчитывали следующие интегральные критерии: максимальную энтропию (H<sub>max</sub>, бит), текущую энтропию (H, бит), относительную энтропию (h), показатели избыточности (R, %) и организации (S, бит) [8].

Информационный анализ и статистическую обработку данных исследования выполняли с помощью табличного редактора «Microsoft Excel – 2010» и программного обеспечения анализа данных AtteStat Версия 13.0 [9]. Цифровые данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей (Q<sub>25</sub>–Q<sub>75</sub>). Для оценки статистической значимости различий между группами использовали критерий Вилкоксона. Различия между группами считали существенными при p < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные результаты показали, что все микроорганизмы обладали способностью к образованию биопленки на поверхности покровного стекла. При анализе отмечены сходства и различия в структуре формирующихся биопленок. Так, во всех экспериментах наблюдали увеличение количества одиночных адгезированных клеток и микроколоний через 48 часов (рис. 1). У всех исследованных штаммов на поверхности стекла преобладали микроколонии, размер которых не превышал 100 мкм<sup>2</sup>.

Различия заключались в изменении соотношения микроколоний различного размера. Формирование биопленки монокультурой *K. pneumoniae* (БЛРС+) происходило за счет равномерного увеличения количества микроколоний размером от 10 до 10000 мкм<sup>2</sup>, их доля в площади поля зрения через 48 часов возрастала на 52–65 %. Размер биопленки, образованной монокультурой *K. pneumoniae*, выделенной из ассоциации *K. pneumoniae* + *S. aureus*,

увеличивался преимущественно за счет микроколоний размером от 100 до 1000 мкм<sup>2</sup>, доля которых повышалась на 42 %. При росте смешанной биопленки *K. pneumoniae* + *S. aureus* наблюдали увеличение количества микроколоний размером более 10000 мкм<sup>2</sup> в 2,6 раза, что привело к увеличению их доли на 62 % по сравнению с предыдущим сроком эксперимента. Установлены значимые различия между количеством и долями микроколоний размером от 1000 до 10000 мкм<sup>2</sup> (p = 0,04), образованных монокультурой *K. pneumoniae*, выделенной из ассоциации *K. pneumoniae* + *S. aureus*, и смешанной культурой *K. pneumoniae* + *S. aureus* через 24 часа и количеством микроколоний размером от 100 до 1000 мкм<sup>2</sup> (p = 0,04) через 48 часов. Необходимо отметить, что независимо от размера, количество и доли микроколоний, образованных монокультурами штаммов на всех сроках эксперимента, были меньше количества и долей микроколоний, образованных ассоциацией микроорганизмов.

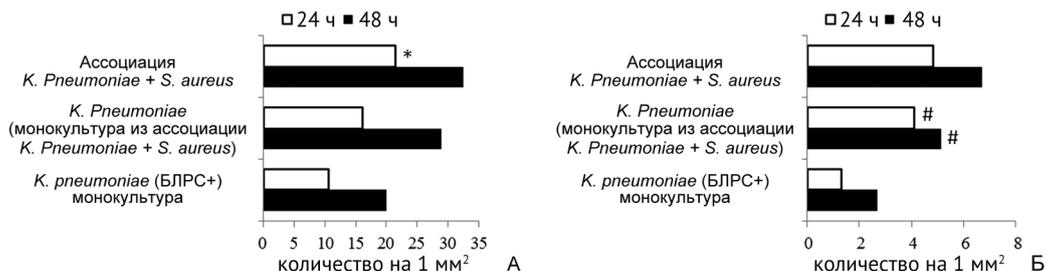


Рис. 1. Изменение количества одиночных адгезированных клеток (А) и микроколоний (Б) на поверхности покровного стекла на этапах эксперимента. Примечание: \* – p < 0,05 – различия значимы по сравнению с монокультурой *K. pneumoniae*, выделенной из ассоциации *K. pneumoniae* + *S. aureus* на соответствующем сроке эксперимента; # – p < 0,05 – различия значимы по сравнению с монокультурой *K. pneumoniae* (БЛРС+) на соответствующем сроке эксперимента

Таким образом, биопленкообразующая способность ассоциации микроорганизмов (*K. Pneumoniae* + *S. aureus*) оказалась выше по сравнению с монокультурами. Полученные результаты подтверждают данные литературы о том, что межвидовые взаимодействия, изменяя физиологию и функции всего сообщества, могут приводить к повышенному образованию биопленки [10, 11].

Известно, что на всех уровнях биологической организации существуют информационные системы, в которых производится, запасается, передается, перерабатывается и воспринимается информация [12]. Микроорганизмы в биопленках, подчиняясь законам термодинамики, вступают в различные симбиотические связи, обмениваются друг другом веществами и энергией, что определяет степень их адаптации к среде обитания [13].

Информационный анализ показал, что информационная емкость системы (максимальная энтропия) при формировании как моно-, так и смешанной биопленки была одинаковой и составляла 2,322 бит (таблица).

В биопленках, формируемых монокультурами, через 48 часов происходило увеличение текущей и относительной энтропии и уменьшение организации системы и коэффициента избыточности. Несмотря на более низкую адгезивную активность биопленки, образованной монокультурой *K. pneumoniae* (БЛРС+), по сравнению монокультурой *K. pneumoniae*, выделенной из ассоциации, их средние информационные показатели были практически одинаковыми.

В биопленках, формируемых ассоциациями клинических штаммов (*K. Pneumoniae* + *S. aureus*), напротив, происходило уменьшение абсолютной и относительной энтропии и увеличение показателей организации и избыточности.

Самые высокие значения информационной энтропии выявлены у ассоциативной биопленки (*K. Pneumoniae* + *S. aureus*), что указывает на более

разнообразный набор элементов в системе и, соответственно, большую гетерогенность. Более низкие значения энтропии одновидовых биопленок по сравнению с ассоциативными свидетельствуют о более однородном составе, а также меньшей степени неупорядоченности.

Анализ информационных характеристик показал, что биопленки, формируемые монокультурами, относятся к детерминированным системам с высоким запасом структурной устойчивости, о чем свидетельствуют величины коэффициентов избыточности, превышающие 30 %. В то время как ассоциативные биопленки представляют собой квазидетерминированные структуры (величины коэффициентов избыточности находились в диапазоне от 10 до 30 %).

Таким образом, полученные результаты показали, что все клинические штаммы обладали способностью к формированию биопленки на поверхности покровного стекла. Штаммы *K. pneumoniae* (БЛРС+), выделенные в монокультурах, отличались более низкой адгезивной способностью по сравнению с монокультурами *K. pneumoniae*, выделенными из ассоциаций со *S. aureus*. Самая высокая адгезивная активность в отношении покровного стекла отмечена у смешанной культуры *K. Pneumoniae* + *S. aureus*.

Информационные характеристики зависели от вида формирующихся биопленок. Общим для биопленок было отсутствие изменений максимально возможного структурного разнообразия. При этом отмечены значимые различия между существующим структурным разнообразием биопленок, образованных монокультурами *K. pneumoniae*, выделенными из ассоциаций, и смешанной культурой *K. Pneumoniae* + *S. aureus*.

Отсутствие выраженной вариабельности информационных показателей в ходе эксперимента в пределах каждого микробного сообщества свидетельствует о стремлении всех систем формирующихся биопленок к сохранению стабильности.

Таблица

Информационные характеристики сформированных in vitro биопленок (Me (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>))

	Срок эксперимента	Информационные показатели				
		H <sub>i</sub> (бит)	H <sub>max</sub> (бит)	h	R, %	S, бит
<i>K. pneumoniae</i> (БЛРС+) монокультура (n = 3)	24 ч	1,357 (1,215 - 1,725)	2,322	0,584 (0,523 - 0,743)	41,561 (25,694 - 47,672)	0,965 (0,597 - 1,107)
	48 ч	1,463 (1,456 - 1,843)	2,322	0,630 (0,627 - 0,794)	36,977 (20,641 - 37,313)	0,859 (0,479 - 0,866)
<i>K. pneumoniae</i> (монокультура из ассоциации <i>K. pneumoniae</i> + <i>S. aureus</i> ) (n = 6)	24 ч	1,352 (1,061 - 1,558)	2,322	0,582 (0,457 - 0,671)	41,755 (32,893 - 54,313)	0,970 (0,764 - 1,261)
	48 ч	1,405 (1,206 - 1,545)	2,322	0,605 (0,520 - 0,665)	39,506 (33,481 - 48,043)	0,917 (0,777 - 1,116)
Ассоциация <i>K. pneumoniae</i> + <i>S. aureus</i> (n = 6)	24 ч	1,871* (1,429 - 1,906)	2,322	0,806* (0,615 - 0,821)	19,406* (17,925 - 38,475)	0,451* (0,416 - 0,893)
	48 ч	1,825* (1,770 - 1,870)	2,322	0,786* (0,762 - 0,806)	21,397* (19,448 - 23,784)	0,497* (0,452 - 0,552)

Примечание. Различия значимы по сравнению с монокультурой *K. pneumoniae*, выделенной из ассоциации *K. Pneumoniae* + *S. aureus* на соответствующем сроке эксперимента: \* - p < 0,05.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. The pathophysiology of chronic osteomyelitis / L.C. Marais, N. Ferreira, C. Aldous, T. le Roux // J. Orthop. 2013. Vol. 12, No 4. P. 14-18. DOI: 10.1016/j.jor.2015.05.017.
2. Леонова С.Н., Рехов А.В., Камека А.Л. Бактериологическое исследование раневого отделяемого у пациентов с локальной и распространённой формой хронического остеомиелита // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2016. Т. 1, № 4 (110). С. 91-94.
3. Pendleton J.N., Gorman S.P., Gilmore B.F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens // Expert Rev. Anti Infect. Ther. 2013. Vol. 11, No 3. P. 297-308. DOI: 10.1586/eri. 13.12.

4. Evaluation of biofilm formation among Klebsiella pneumoniae isolates and molecular characterization by ERIC-PCR / K. Seifi, H. Kazemian, H. Heidari, F. Rezagholizadeh, Y. Saeed, F. Shirvani, H. Houry // Jundishapur J. Microbiol. 2016. Vol. 9, No 1. P. e30682. DOI: 10.5812/jjm.30682.
5. Yang D., Zhang Z. Biofilm-forming Klebsiella pneumoniae strains have greater likelihood of producing extended-spectrum beta-lactamases // J. Hosp.Infect. 2008. Vol. 68, No 4. P. 369-371. DOI: 10.1016/j.jhin.2008.02.001.
6. Correlation between biofilm formation and resistance toward different commonly used antibiotics along with extended spectrum beta lactamase production in uropathogenic Escherichia coli isolated from the patients suspected of urinary tract infections visiting Shree Birendra Hospital, Chhauni, Kathmandu, Nepal / S. Neupane, N.D. Pant, S. Khatiwada, R. Chaudhary, M.R. Banjara // Antimicrob. Resist. Infect. Control. 2016. Vol. 5. P. 5. DOI: 10.1186/s13756-016-0104-9.
7. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections / C.J. Sanchez Jr, K. Mende, M.L. Beckius, K.S. Akers, D.R. Romano, J.C. Wenke, C.K. Murray // BMC Infect. Dis. 2013. Vol. 13. P. 47. DOI: 10.1186/1471-2334-13-47.
8. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии : учеб. пособие. М. : Медицина, 2002. 240 с.
9. Гайдышев И.П. Решение научных и инженерных задач средствами Excel, VBA и C/C++. СПб. : БХВ-Петербург, 2004. 505 с.
10. Шипицына И.В., Осипова Е.В., Розова Л.В. Адгезивная способность клинических штаммов Enterobacter cloacae, выделенных из ран пациентов с хроническим остеомиелитом, и их чувствительность к антимикробным препаратам // Новости хирургии. 2017. Т. 25, № 3. С. 273-278.
11. Varposhti M., Entezari F., Feizabadi M.M. Synergistic interactions in mixed-species biofilms of pathogenic bacteria from the respiratory tract // Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2014. Vol.47, No 5. P. 649-652.
12. Значение информации для генной инженерии как критерия генетического гомеостаза (особи и популяции) / В.А. Краснов, Ш.А. Якубов, Т.Ф. Суворова, Д.Ш. Якубова, Р.Б. Смирнов // Вестн. Астрахан. гос. техн. ун-та. 2004. № 2 (21). С. 208-214.
13. Тец В.В. Бактериальные сообщества // Клеточные сообщества / под ред. В Теца. СПб.: Изд-во СПбГМУ, 1998. С. 15-73.

## REFERENCES

1. Marais L.C., Ferreira N., Aldous C., Le Roux T. The pathophysiology of chronic osteomyelitis. *J. Orthop.* 2013, vol. 12, No 4. P. 14-18. DOI: 10.1016/j.jor.2015.05.017.
2. Leonova S.N., Rekhov A.V., Kameka A.L. Bakteriologicheskoe issledovanie ranevogo otdeliemogo u patsientov s lokal'noi i rasprostranennoi formoi khronicheskogo osteomiellita [Bacteriological studying of the wound discharge in patients with the local and common form of chronic osteomyelitis]. *Biul. VSNTs SO RAMN.* 2016, vol. 1, no. 4(110), pp. 91-94. (In Russ.)
3. Pendleton J.N., Gorman S.P., Gilmore B.F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2013, vol. 11, no. 3, pp. 297-308. DOI: 10.1586/eri.13.12.
4. Seifi K., Kazemian H., Heidari H., Rezagholizadeh F., Saeed Y., Shirvani F., Houry H. Evaluation of biofilm formation among Klebsiella pneumoniae isolates and molecular characterization by ERIC-PCR. *Jundishapur J. Microbiol.* 2016, vol. 9, no. 1, pp. e30682. DOI: 10.5812/jjm.30682.
5. Yang D., Zhang Z. Biofilm-forming Klebsiella pneumoniae strains have greater likelihood of producing extended-spectrum beta-lactamases. *J. Hosp.Infect.* 2008, vol. 68, no. 4, pp. 369-371. DOI: 10.1016/j.jhin.2008.02.001.
6. Neupane S., Pant N.D., Khatiwada S., Chaudhary R., Banjara M.R. Correlation between biofilm formation and resistance toward different commonly used antibiotics along with extended spectrum beta lactamase production in uropathogenic Escherichia coli isolated from the patients suspected of urinary tract infections visiting Shree Birendra Hospital, Chhauni, Kathmandu, Nepal. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2016, vol. 5, pp. 5. DOI: 10.1186/s13756-016-0104-9.
7. Sanchez C.J. Jr, Mende K., Beckius M.L., Akers K.S. , Romano D.R., Wenke J.C. , Murray C.K. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect. Dis.* 2013, vol. 13, pp. 47. DOI: 10.1186/1471-2334-13-47.
8. Avtandilov G.G. *Osnovy kolichestvennoi patologicheskoi anatomii: ucheb. posobie* [Fundamentals of quantitative pathological anatomy: manual]. М., Meditsina, 2002, 240 p. (In Russ.)
9. Gaidyshev I.P. *Reshenie nauchnykh i inzhenernykh zadach sredstvami Excel, VBA i C/C++* [Solution of scientific and engineering problems by means of Excel, VBA and C/C++]. SPb., BKhV-Peterburg, 2004, 505 p. (In Russ.)
10. Shipitsyna I.V., Osipova E.V., Rozova L.V. Adgezivnaia sposobnost' klinicheskikh shtammov Enterobacter cloacae, vydelennykh iz ran patsientov s khronicheskim osteomiellitom, i ikh chuvstvitel'nost' k antimikrobnym preparatam [Adhesive potential of Enterobacter cloacae clinical strains isolated from the wounds of patients with chronic osteomyelitis and their sensitivity to antimicrobial preparations]. *Novosti Khirurgii.* 2017, vol. 25, no. 3, pp. 273-278. (In Russ.)
11. Varposhti M., Entezari F., Feizabadi M.M. Synergistic interactions in mixed-species biofilms of pathogenic bacteria from the respiratory tract. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2014, vol.47, no. 5, pp. 649-652.
12. Krasnov V.A., Iakubov Sh.A., Suvorova T.F., Iakubova D.Sh., Smirnov R.B. Znachenie informatsii dlia gennoi inzhenerii kak kriteriia geneticheskogo gomeostaza (osobi i populiatsii) [The value of information for genetic engineering as a criterion of genetic homeostasis (individuals and populations)]. *Vestn. Astrakhan. Gos. Tekhn. Un-ta.* 2004, no. 2 (21), pp. 208-214. (In Russ.)
13. Tets V.V. *Bakterial'nye soobshchestva* [Bacterial communities]. In: V. Tets, ed. *Kletochnye soobshchestva* [Cell Communities]. SPb., Izd-vo SPbGMU, 1998, pp. 15-73. (In Russ.)

Рукопись поступила 18.09.2017

### Сведения об авторах:

1. Осипова Елена Владимировна, к. б. н., ФГБУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган, Россия, Email: E-V-Osipova@mail.ru
2. Шипицына Ирина Владимировна, к. б. н., ФГБУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган, Россия

### Information about the authors:

1. Elena V. Osipova, Ph.D. of Biological Sciences, Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopaedics, Kurgan, Russian Federation, Email: E-V-Osipova@mail.ru
2. Irina V. Shipitsyna, Ph.D. of Biological Sciences, Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopaedics, Kurgan, Russian Federation