

ЛЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ГНОЙНЫХ РАН ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ФОРМАМИ АНТИСЕПТИКОВ

Григорьян А.Ю.

*Курский государственный медицинский университет
Кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии
Российская Федерация, город Курск*

Ключевые слова: лечение ран, мирамистин, метронидазол, хлоргексидина биглюконат, метилурацил.

Резюме: Исследование выполнялось на экспериментальной модели гнойной раны. В ходе эксперимента была проведена оценка противомикробной активности разработанных препаратов. Результаты исследования показали преимущества применения комбинации Мирамистина с Метронидазолом на натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и препарата Хлоргексидина биглюконат с Метилурацилом на полиметилсилоксана полигидрате по сравнению с препаратом Левомеколь.

Resume: This research was done in an experimental model of purulent wounds. The experiment assessed the antimicrobial activity of the drugs developed. The results showed the advantages of using a combination with Miramistin and Metronidazole on Sodium Carboxymethyl Cellulose and drug Chlorhexidine bigluconate with Methyluracil on Polymethylsiloxane Polyhydrates compared with the drug Laevomecolum.

Актуальность. Одной из проблем современной хирургии является проблема лечения гнойных ран. По литературным данным гнойные осложнения составляют от 35% до 45% от всех хирургических заболеваний. Доля внутригоспитальной инфекции составляет от 12% до 22%, а летальность достигает 25% [1, 3, 4]. Это связано с распространенностью ран различной этиологии (острые гнойно-воспалительные процессы мягких тканей, хронические трофические раны, в том числе диабетическая стопа, послеоперационные раны и др.), высокой летальностью, большими материальными затратами на лечение [2, 6]. В арсенале у врачей имеется огромный спектр методов лечения гнойных ран, но за последние годы микрофлора ран и ее биологические свойства претерпели существенные изменения, проявляющиеся быстрой потерей чувствительности к современным антибактериальным препаратам [5]. Данные обстоятельства диктуют необходимость разработки новых комбинаций с антисептиками иммобилизованными на основе, способной пролонгировано высвободить активное вещество в рану, что уменьшит частоту перевязок, которые травмируют поверхность раны и затягивают процесс восстановления целостности мягких тканей.

Цель исследования: изучить ранозаживляющую активность разработанных нами иммобилизованных препаратов с антисептиками Мирамистин и Хлоргексидина биглюконат в сравнительном аспекте с официальной мазью «Левомеколь».

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили препараты, состав которых разработан коллективом Курского государственного медицинского университета.

Состав 1: Раствор Хлоргексидин биглюконат 0,5% – 30,0 грамм, Метилурацил – 2,0 грамма, Полиметилсилоксана полигидрат – 70,0 грамм

Состав 2: Раствор Мирамистина 0,01% - 100,0 грамм, Метронидазол – 1,0 грамм, Натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы – 4,0 грамма

В экспериментах *in vitro* изучали антимикробный спектр мази «Левомеколь» и изучаемой иммобилизированной формы Хлоргексидина биглюконата и Мирамистина. Было выполнено по 6 параллельных исследований каждого экспериментального образца. Определение спектра антимикробного действия препаратов осуществляли в опытах методом диффузии в агар на плотных питательных средах с использованием тест-штаммов микроорганизмов *St. aureus* ATCC 6538-P, *Bac. cereus* ATCC 10702, *E. coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 885-653. В экспериментах на животных изучена ранозаживляющая активность разработанных препаратов в сравнении с использованием официальной мази «Левомеколь».

Эксперименты *in vivo* выполнены на 180 белых крысах-самцах породы «Вистар». Для исследования отбирали животных массой $182,0 \pm 5,12$ г без внешних признаков заболевания. Эксперимент выполнен в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes, 18.03.1986). Все животные содержались в одинаковых условиях на стандартном пищевом рационе.

Животным под наркозом в стерильных условиях моделировалась гнойная рана по методике П.И. Толстых. Экспериментальные животные были разделены на 3 серии по 60 особей в каждой: в серии сравнения ежедневно производилась обработка раны 3% раствором перекиси водорода и наложение маревой салфетки с официальной мазью «Левомеколь». В серии опытная А ежедневно производилась обработка раны 3% раствором перекиси водорода и наложение маревой салфетки с иммобилизированной формой хлоргексидина биглюконата. В серии опытная В ежедневно производилась обработка раны 3% раствором перекиси водорода и наложение маревой салфетки с иммобилизированной формой Мирамистина.

Переязки экспериментальным животным во всех сериях производили один раз в день, ежедневно в течение 14 суток.

Течение раневого процесса у экспериментальных животных оценивали планиметрическим, микробиологическим, гистологическим методами. Протоколирование показателей и выведение животных из эксперимента осуществляли на 1-е, 3-е, 5-е, 8-е, 10-е и 15-е сутки от начала лечения.

При планиметрии гнойной раны оценивались динамика уменьшения площади и скорости заживления (по методу Л.Н. Поповой).

Во время стандартного бактериологического исследования определялась микробная обсемененность раны (КОЕ/1г ткани) путем посева инфильтрата раны в чашки Петри с плотной питательной средой (агар).

Гистологическое изучение микропрепаратов ран производили на 1-е, 3-е, 5-е, 8-е, 10-е сутки от начала лечения после выведения подопытного животного из эксперимента. При морфометрическом исследовании на срезах гистологических препаратов при увеличении x400, производили подсчет фибробластов, гранулоцитов, лимфоцитов и макрофагов до 100 клеток, полученные результаты выражали в процентах. При цитологическом исследовании определялся клеточный состав инфильтрата на 3-е, 5-е, 8-е, 10-е сутки. Для объективизации течения раневого процесса рассчитывали клеточный индекс по формуле:

$$\text{Клеточный индекс} = \frac{\text{Макрофаги} + \text{Фибробласты} + \text{Полибласты}}{\text{Гранулоциты} + \text{Лимфоциты}}$$

Клетки, расположенные в числителе, характеризуют репаративные процессы, а в знаменателе – выраженность воспалительных процессов. Чем меньше индекс, тем более выражены воспалительные процессы в ране.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием методов однофакторного дисперсионного анализа. Вычисляли средние величины количественных показателей (M) и среднюю ошибку средней (m). Распределение признаков определяли по критерию Шапиро-Уилка. Достоверность различий оценивали по критерию Ньюмена-Кейлса.

Результаты собственных исследований.

Результаты исследования спектра антимикробного действия иммобилизованных на основе натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы препаратов различного состава в отношении тест-штаммов *St. aureus* ATCC 6538-P, *Bac. cereus* ATCC 10702, *E. coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 885-653 представлены в таблице 1.

Таблица 1

Спектр антимикробного действия разработанных иммобилизованных препаратов (M±m)

Исследуемый состав	Левомеколь	Состав 1	Состав 2
<i>St. aureus</i> ATCC 6538-P	30,2±4,79	29,5±2,25	28,5±1,87
<i>Bac. cereus</i> ATCC 10702	21,7±3,01	22,7±3,05	27,0±2,19 ^{2,3}
<i>E. coli</i> ATCC 25922	26,5±5,01	28,9±1,12	29,2±1,47
<i>Proteus vulgaris</i>	26,2±5,56	26,2±2,42	24,7±1,03
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	26,2±4,58	24,3±2,58	25,5±2,59
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	11,7±2,07	10,6±2,33	27,7±1,63 ^{2,3}

Примечание: ¹ - p≤0,05 при сравнении мази «Левомеколь» с составом 1; ² - p≤0,05 при сравнении мази «Левомеколь» с составом 2; ³ - p≤0,05 при сравнении состава 1 с составом 2.

Из анализа данных, представленных в таблице 1, следует, что разработанные нами препараты обладают высоким противомикробным действием в отношении всех исследуемых тест-штаммов. При сравнении с мазью «Левомеколь» статистически значимых отличий с составом 1 выявлено не было, однако состав 2 статистически достоверно превосходил по зонам задержки роста и мазь «Левомеколь», и состав 1 в отношении *Vac. cereus* ATCC 10702 и *Candida albicans* ATCC 885-653.

Для изучения ранозаживляющей активности использовался планиметрический метод: процент уменьшения площади ран и скорость заживления ран у экспериментальных животных. Исходные экспериментальные раны у всех животных были сопоставимы по своей площади ($252,4 \pm 4,85 \text{ мм}^2$). С течением времени во всех сериях происходило увеличение процента уменьшения площади ран. Статистически достоверные отличия между опытной серией А и серией сравнения наблюдались практически в течение всего срока эксперимента, а между опытной серией В и серией сравнения - лишь начиная с 10 суток наблюдения. Между опытными сериями статистически значимых отличий выявлено не было.

Скорость заживления (СЗ) в опытной серии А была максимальной на отрезке 1-3 сутки ($16,5 \pm 0,47\%/\text{сутки}$), что достоверно превосходило значения в остальных сериях, затем СЗ постепенно снижалась, что указывает на максимальную активность препарата в первую фазу раневого процесса. В свою очередь СЗ в опытной серии В была стабильно высокой на протяжении всего срока наблюдения, что указывает на активность препарата в первую и вторую фазу раневого процесса.

Анализ полученных результатов микробиологического исследования ран представлен в таблице 2.

Таблица 2

Динамика микробной обсемененности ран (КОЕ в 1 г ткани) ($M \pm m$)

Серии	(КОЕ в 1 г ткани)				
	1 сут	3 сут	5 сут	8 сут	10 сут
	n=10 (в каждом исследовании)				
Сравнения	$14,7 \pm 1,09 \times 10^7$	$19,2 \pm 2,55 \times 10^6$	$16,6 \pm 1,29 \times 10^5$	$15,5 \pm 0,38 \times 10^4$	$7,3 \pm 0,60 \times 10^4$
Опытная А	$14,5 \pm 2,13 \times 10^7$	$13,2 \pm 1,83 \times 10^6$	$12,3 \pm 1,91 \times 10^5$	$9,3 \pm 1,12 \times 10^{4(1)}$	$1,1 \pm 0,27 \times 10^{4(1)}$
Опытная В	$14,6 \pm 1,95 \times 10^7$	$13,4 \pm 2,84 \times 10^6$	$12,9 \pm 1,57 \times 10^5$	$9,0 \pm 2,15 \times 10^{4(2)}$	$1,2 \pm 0,35 \times 10^{4(2)}$

Примечание: ¹ - $p \leq 0,05$ при сопоставлении серии сравнения с опытной серией А; ² - $p \leq 0,05$ при сопоставлении серии сравнения с опытной серией В; ³ - $p \leq 0,05$ при сопоставлении опытной серии А с опытной серией В.

Во всех сериях микробная обсемененность ран на 1-е сутки составляла в среднем $14,6 \pm 1,72 \times 10^7$ КОЕ/г. С течением времени во всех сериях происходило уменьшение микробной обсемененности ран. Исходя из данных, представленных в таблице 4 можно говорить о том, что статистические значимые отличия между опытными сериями и серией сравнения были отмечены, начиная с 8 суток наблюдения, что свидетельствует о высокой деконтаминационной активности наших

препаратов. Между опытными сериями достоверных различий выявлено не было.

Гистологическое изучение микропрепаратов ран производили на 1-е, 3-е, 5-е, 8-е, 10-е сутки от начала лечения после выведения животного из эксперимента.

Во всех сериях к первым суткам после моделирования раневого дефекта вся поверхность раны была покрыта массивным фибринозно-гнойными массами, в которых обнаруживалось большое количество погибших лейкоцитов. Подлежащие ткани резко отечны и инфильтрированы полиморфно-ядерными лейкоцитами (ПЯЛ) и макрофагами на разных стадиях дифференцировки, пучки коллагеновых волокон разрыхлены и разделены друг от друга очагами инфильтрата. Кровеносные и лимфатические сосуды расширены. Отек тканей и инфильтрат в сочетании с пропитыванием эритроцитами распространялся за пределы раневого дефекта по всей толщине дермы и переходил на гиподерму.

На 5 сутки наблюдения в серии сравнения рана покрыта лейкоцитарно-некротическим струпом, под струпом грануляционная ткань, признаки эпителизации отсутствуют. Глубокие участки дермы несколько отечны. В опытной серии А пролиферативные процессы протекали лучше, чем в других сериях. Однако в некоторых препаратах наблюдалась реакция макрофагов, которая проявлялась увеличенным количеством ПЯЛ в инфильтрате. В опытной серии В грануляционная ткань покрыта фибрином и достаточно четко отграничена грануляционным валом. В молодой грануляционной ткани наблюдаются ярко выраженные процессы неоангиогенеза. Грануляционная ткань инфильтрирована нейтрофилами, лимфоцитами и макрофагами.

На 10 сутки в серии сравнения происходит формирование эпителиального вала на границе раневого дефекта. Грануляционная ткань четко отграничена от интактной дермы и инфильтрирована лейкоцитами. Во всех гистопрепаратах опытной серии А отмечалось полное покрытие грануляций эпидермисом, который состоял из 2-х слоев клеток. Производные эпидермиса отсутствовали по всей площади раневого дефекта. В опытной серии В хорошо выражены признаки эпителизации раны. Инфильтрация поверхностных слоев дермы сохранена. Новообразованная соединительная ткань хорошо васкуляризована, признаков отека нет. Реактивные изменения менее выражены. Участки регенерировавшего эпителия без выраженных морфологических изменений.

С целью определения отличительных особенностей процесса репаративной регенерации в сравниваемых экспериментальных сериях нами были исследованы поперечные срезы экспериментальных ран с окружающими их тканями кожи и мышц и проведена морфометрия, результаты которой представлены в таблице 3.

Таблица 3

Динамика состава инфильтрата ран в процессе лечения ($M \pm m$) в % ($n=10$)

Показатели	Серии	Сроки лечения, сутки			
		3-и	5-е	8-е	10-е

Фибробласты	Сравнения	31,9±1,17	32,2±0,94	43,3±1,96	51,4±0,57
	Опытная А	32,4±2,29	42,8±1,36 ¹	55,4±2,32 ¹	60,8±2,18 ¹
	Опытная В	27,0±1,92	35,3±1,25 ³	54,3±2,12 ²	65,1±2,07 ²
Макрофаги	Сравнения	20,6±1,51	21,4±1,26	18,4±1,51	14,7±1,64
	Опытная А	16,4±0,75 ¹	12,2±0,58 ¹	10,6±0,68 ¹	8,2±0,49 ¹
	Опытная В	23,1±1,66 ³	18,5±1,35 ³	14,6±1,58 ^{2,3}	9,1±1,37 ²
Лимфоциты	Сравнения	17,5±1,27	19,1±2,13	16,5±2,42	15,4±1,58
	Опытная А	19,6±0,51	16,0±0,45	15,2±0,58	15,5±1,00
	Опытная В	24,8±2,25 ^{2,3}	24,8±2,89 ³	15,0±3,37	12,3±2,26
Гранулоциты	Сравнения	32,1±1,91	29,2±1,66	24,4±2,01	20,4±0,97
	Опытная А	33,0±2,28	30,8±1,55	20,6±1,36	16,8±0,86 ¹
	Опытная В	24,9±2,74 ^{2,3}	21,4±1,26 ^{2,3}	16,1±1,45 ²	13,5±1,27 ^{2,3}
Клеточный индекс	Сравнения	1,06±0,034	1,10±0,027	1,51±0,041	1,85±0,027
	Опытная А	0,93±0,017 ¹	1,18±0,022	1,85±0,036 ¹	2,14±0,031 ¹
	Опытная В	1,01±0,014 ³	1,16±0,021	2,22±0,025 ^{2,3}	2,87±0,042 ^{2,3}

Примечание: ¹ - $p \leq 0,05$ при сопоставлении серии сравнения с опытной серией А; ² - $p \leq 0,05$ при сопоставлении серии сравнения с опытной серией В; ³ - $p \leq 0,05$ при сопоставлении опытной серии А с опытной серией В.

По данным представленным в таблице 5 можно заключить, что в процессе лечения во всех сериях происходит увеличение количества фибробластов по сравнению с макрофагами, лимфоцитами и гранулоцитами. Статистически достоверное преобладание фибробластов над остальными клеточными элементами раньше всего отмечается в опытной серии А (на 5 сутки), что свидетельствует о высокой регенераторной активности препарата состава 1 в первую фазу раневого процесса. Однако начиная с 8 суток максимальные значения фибробластов отмечались в опытной серии В по сравнению с остальными сериями. Кроме того, уменьшение количества макрофагов (по отношению к лимфоцитам) и одновременное повышение количества лимфоцитов (над макрофагами) раньше всего происходило в опытной серии А (на 3 сутки), в опытной серии В – на 3-5 сутки, а в серии сравнения - на 8-10 сутки. Данные обстоятельства так же свидетельствуют о высокой регенераторной активности наших препаратов и о более ранней смене фаз раневого процесса.

Вывод. Таким образом, анализ результатов, полученных при микробиологическом исследовании, показал, что разработанные нами препараты Хлоргексидина биглюконат с Метилурацилом иммобилизованные на полиметилсилоксана полигидрате и Мирамистин с Метронидазолом иммобилизованные на натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы обладают широким спектром антимикробной активности в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов. Полученные нами результаты планиметрических, микробиологических и гистологических исследований гнойных ран свидетельствуют о более выраженном положительном эффекте санации раны разработанными нами препаратами с Хлоргексидина биглюконатом и Мирамистином, чем стандартной мазью «Левомеколь». Кроме того, было отмечено, что

максимальная активность препарата с Хлоргесидина биглюконатом приходится на первую фазу раневого процесса и способствует более раннему началу регенерации, а препарат с Мирамистином стабильно высоко активен на всех фазах раневого процесса.

Литература

1. Блатун Л.А. Местное медикаментозное лечение ран // Хирургия. – 2011. - №4. – С. 51-59.
2. Жилина С.В., Миронов А.Ю., Поликарпова С.В. Стрептококки в этиологии гнойно - воспалительных заболеваний кожи и мягких тканей // Курский науч.- практ. вестн. «Человек и его здоровье». – 2009. - №2. – С. 46-53.
3. Плотников Ф.В. Комплексное лечение пациентов с гнойными ранами в зависимости от способности микроорганизмов-возбудителей формировать биопленку // Новости хирургии. – 2014. - №22(5). – С. 575-581.
4. Чекмарева И.А., Блатун Л.А., Терехова Л.П. Морфофункциональные аспекты регенерации ран при лечении йод-содержащими мазями // Хирургия. – 2014. - №1. – С. 54-58.
5. Belda F.J. Supplemental Perioperative Oxygen and the Risk of Surgical Wound Infection: A Randomized Controlled Trial // JAMA. – 2005; 294: 2035-2042.
6. George K. Are Quantitative Bacterial Wound Cultures Useful? // J. Clin. Microbiol. – 2014; 52: 2753-2756.