

УДК 615.281: 616-08-031.84

ОБОСНОВАНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ПОДХОДА К МЕСТНОМУ ЛЕЧЕНИЮ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ**Бабушкина И.В., Мамонова И.А., Гладкова Е.В., Белова С.В., Ульянов В.Ю.***НИИТОН ФГБОУ ВО СГМУ им. В.И. Разумовского МЗ РФ, Саратов, e-mail: 10051968@mail.ru*

Разработан комплексный препарат, состоящий из наночастиц меди, серебра и вспомогательного компонента (порошкообразной основы) и предназначенный для санации условно-асептических и гнойных ран и оптимизации их репаративной регенерации. Предложен состав препарата, обеспечивающий выраженный антибактериальный и регенераторный эффекты. Дополнительно введенный в состав оксид цинка обладает умеренно выраженным антибактериальным действием и выраженным фунгицидным действием, что является важным при профилактике вторичных кандидозов и лечении ран, инфицированных дрожжеподобными грибами рода *Candida*. Присутствие оксида цинка позволяет также снизить выраженность протекающих экссудативных процессов и уменьшить местные проявления воспаления за счет выраженного абсорбирующего эффекта, что является важным в условиях ран с обильной экссудацией. Эффективность разработанного препарата в условиях экспериментальной гнойной раны, инфицированной ассоциатом клинических штаммов *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* доказана бактериологическими и планиметрическими исследованиями.

Ключевые слова: экспериментальная рана, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, наночастицы, медь, серебро, оксид цинка

THE RATIONALE FOR A COMPLEX APPROACH TO LOCAL TREATMENT OF SEPTIC INFLAMMATORY COMPLICATIONS**Babushkina I.V., Mamonova I.A., Gladkova E.V., Belova S.V., Ulyanov V.Yu.***Research Institute of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery VSBEI HE «Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky» of the Ministry of Health of Russia, Saratov, e-mail: 10051968@mail.ru*

A complex medication with copper and silver nanoparticles on the basis of coadjuvant pulverized component aimed at arbitrary aseptic and septic wound sanitation and the optimization of reparative and regenerative processes in the wounds was developed within the framework of our investigation. We propose the formula providing significant antimicrobial and regenerative effect. Zinc oxide added to the composition has moderate antimicrobial and frank antifungal effect essential for the preventive treatment of secondary candidosis and treatment of the wounds contaminated with yeast-like fungi *Candida*. Apart from that zinc oxide helps to lessen the intensity of exudative processes as well as local excitation and inflammation due to its frank adsorbing effect which is important in wounds with exuberant exudation. The effectiveness of the medication is proved on experimental septic wounds contaminated with the associate of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* clinical strains by the complex of bacteriological and planimetric methods.

Keywords: experimental wound, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, nanoparticles, copper, silver, pulverized basis, zinc oxide

В последнее десятилетие одновременно с общим ростом инфекционно-воспалительных осложнений, традиционно обусловленных *S. aureus* и *S. epidermidis*, а также представителями грамотрицательной неферментирующей флоры и энтеробактериями, возрастает частота осложнений, вызванных грибами рода *Candida* [4]. Это обусловлено широким, часто нерациональным применением антибиотиков и кортикостероидных препаратов, увеличением числа больных с измененной микрофлорой желудочно-кишечного тракта, ростом количества хирургических больных с ослабленным иммунитетом (проведение операций большого объема, повышение частоты применения интенсивных терапевтических мероприятий с иммуносупрессивными эффектами, повышение частоты операций у больных с тяжелым преморбидным фоном и др.) [2, 4]. Несмотря на клиническую значимость инфекций, вызванных грибами

рода *Candida* для пациентов травматолого-ортопедического стационара, возможности диагностики и лечения инфекций, вызванных *Candida* spp., ограничены.

Возникает задача разработать препараты, эффективно действующие как на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы, так и на грибы рода *Candida*.

Результаты многочисленных исследований [1, 2, 6] свидетельствуют о высокой активности местного антибактериального лечения наночастицами металлов в отношении возбудителей раневой инфекции.

Антимикотическая профилактика и лечение осложнений, вызванной грибковой флорой, становится важной составляющей частью успешного лечения поврежденной кожи и мягких тканей различного генеза [4]. Механизм антимикотического действия наночастиц серебра и меди тщательно изучается. В ряде работ [2, 8] показано, что антимикробный эффект наночастиц

серебра в отношении бактерий и грибов рода *Candida* обусловлен их связыванием с белками и липидами клеточных мембран и, вследствие этого, изменением трансмембранного потенциала, повреждением мембраны и гибелью клетки. Наночастицы серебра и меди избирательно токсичны по отношению к клеткам прокариот и слабо влияют на прокариотические клетки.

При острой и подострой формах воспалительного процесса и его поверхностной локализации целесообразной является применение порошкообразных лекарственных форм. Порошкообразная основа подобных препаратов обладает выраженным дренирующим действием, активно абсорбирует кровь и раневую экссудат, являющиеся питательной средой для бактерий, эти препараты не создают плёнки на ране, обеспечивая свободный доступ кислорода к повреждённым клеткам тканей, ускоряя естественные процессы заживления ран [3, 5].

Введение в состав применяемых порошкообразных препаратов, в том числе баноцина, антибиотиков может приводить к селекции антибиотикорезистентных штаммов, местным аллергическим реакциям, и нарушению полноценной репаративной регенерации ран. В состав предлагаемого препарата включены наночастицы серебра и меди, что обеспечивает высокую антимикробную эффективность, значительно уменьшает возможность развития вторичного инфицирования и ускоряет процесс регенерации.

В связи с многообразием процессов течения гнойно-инфицированных реакций, в том числе, за счет инфицирования ран ассоциатами возбудителей (наиболее часто это сочетание *S. aureus* и *C. albicans*), возникает потребность в разработке линейки препаратов направленного действия, позволяющих оказывать лечебное воздействие в зависимости от особенностей течения процесса. Этим обусловлено появление новых технических решений.

Целью исследований являлась разработка ранозаживляющего препарата с расширенным спектром применения для лечения гнойных ран, инфицированных не только грамотрицательными и грамположительными бактериями, но и грибами рода *Candida*, а также их ассоциатами, в том числе с обильной экссудацией, обладающего выраженными дренирующими и сорбционными свойствами.

Материалы и методы исследования

В работе использовали наночастицы меди и серебра, синтезированные с помощью плазменной технологии, дисперсность частиц меди 30-40 нм, частиц серебра 30-70 нм. В исследовании использовали 40 белых беспородных крыс массой 170 ± 20 г. Исследования проводились в соответствии с Хельсинкской

декларацией 1975 г. и ее пересмотром в 1983 г. Содержание животных, питание и уход за ними проводились согласно «Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) от 06.04.1973 г.» и не противоречили Женевской Конвенции 1985 г. о «Международных принципах биомедицинских исследований с использованием животных».

У животных моделировали гнойную рану мягких тканей: после депиляции и обработки кожи, в асептических условиях, под наркозом в межлопаточной области иссекали кожу в виде квадрата 2×2 см² (400 мм²) по контуру, предварительно нанесенным трафаретом. Края и дно раны раздавливали зажимом Кохера. В рану вносили 0,1 мл взвеси суточной культуры клинических штаммов *S. aureus* в количестве 5×10^6 КОЕ/мл и *C. albicans* в количестве 5×10^6 КОЕ/мл. На 3-и сутки происходило формирование гнойной раны с обильной экссудацией.

В группе сравнения обработку проводили путем удаления некротических тканей и нанесения на раневую поверхность порошкообразной основы препарата (кукурузного крахмала) в количестве 300 мг. В опытной группе после первичной обработки препарат наносили из расчета 300 мг препарата на 400 мм² раневой поверхности и оставляли на 3-5 мин. до адсорбции раневого экссудата препаратом и фиксации его на поверхности раны, обработку повторяли 1 раз в день ежедневно.

На протяжении всего эксперимента учитывались наличие и характер воспалительной реакции, состояние краев и дна раны, сроки очищения раны от некротических тканей и появления грануляций, сроки начала эпителизации ран. Использовали методы планиметрических и бактериологического исследования ран на 3-и, 5-е, 7-е, 10-е и 14-е сутки.

Бактериологические методы исследования: выделение и идентификация микроорганизмов осуществлялась по общепринятым методикам в соответствии с Приказом МЗ СССР № 535. Штаммы микроорганизмов выделяли из раневого экссудата пациентов травматолого-ортопедического стационара. Изучали морфологические, культуральные и тинкториальные свойства микроорганизмов. Микроорганизмы идентифицировали на микробиологическом анализаторе BD BBL™ Crystal™ AutoReader (Becton Dickinson, США) с применением панелей Crystal™ Gram-Positive ID Kit (Becton Dickinson, США). Для пробоподготовки использовали Densi-La-Meter (Pliva-Lachema Diagnostika, Чехия), предназначенный для определения мутности разведения микроорганизмов в единицах по МакФарланду (от 0,0 до 15).

Бактериологическое исследование экспериментальной раны включало качественное и количественное изучение раневой микрофлоры в динамике на 3-и, 5-е, 7-е, 14-е сутки лечения. Биоптат с поверхности гнойной раны брали в количестве 0,2-0,4 г. Материал суспендировали в изотоническом растворе NaCl с последующим разведением до 10^9 КОЕ/мл, по 100 мкл высевали на плотную питательную среду, помещали в термостат при 37 °C на 24 часа, затем производили подсчет колоний.

Количество микроорганизмов в 1 г биоматериала вычисляли по формуле:

$$N = n \times P \times K \times 10, \quad (1)$$

где N – число колоний на 1 г биоматериала;
n – количество колоний, выросших на чашке Петри;
p – показатель пересчета на 1 г биоматериала;

К – степень разведения материала;
10 – показатель пересчета посевной дозы.

Планиметрические методы исследования: для получения объективных показателей заживления ран вторичным натяжением использовали планиметрический метод Л.Н. Поповой, основанный на регистрации скорости уменьшения раневой поверхности во времени. Исследования осуществляли следующим образом: на рану помещается стерильная пластинка полимера, на нее наносится контур раны, затем подсчитывали площадь раны.

Статистические методы исследования: анализ данных произведён с помощью стандартных методов статистики с использованием программного продукта для ПК Statistica 6.0 фирмы StatSoft@ Inc., USA. Для представления итоговых данных использованы стандартные методы вариационной статистики с определением критерия достоверности по Стъуденту. Достоверным считали результаты при $p < 0,05$, что соответствует требованиям, предъявляемым к медико-биологическим исследованиям. Методы статистической обработки полученного материала позволили подтвердить степень достоверности проведённых исследований.

Результаты исследования и их обсуждение

Экспериментальным путем подобран оптимальный состав и соотношение компонентов препарата. Данный порошкообразный препарат с антибактериальным и регенерирующим эффектами содержит наночастицы меди с дисперсностью 30-40 нм, наночастицы серебра с дисперсностью 40-50 нм, оксид цинка и кукурузный крахмал при следующем соотношении компонентов:

- наночастицы меди – 0,05-0,07;
- наночастицы серебра – 0,03-0,05;
- оксид цинка – 19-21;
- кукурузный крахмал – остальное.

Препарат отличается от ранее разработанных модификаций введением в состав оксида цинка, обладающего антибактериальным и фунгицидным действием, что

является важным при профилактике вторичных кандидозов и при лечении ран, инфицированных грибов рода *Candida*. Оксид цинка обладает выраженным адсорбирующим и противовоспалительным эффектом. Корочка на раневой поверхности из порошкообразного препарата и тканевого экссудата позволяет изолировать раневую поверхность от проникновения патогенной и условно-патогенной микрофлоры, обеспечивает абсорбцию раневого экссудата, что является важным условием для обеспечения протекания процесса регенерации.

В табл. 1 представлены данные планиметрических исследований – изменение площади поверхности гнойной раны в опытной группе и группе сравнения.

Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что скорость заживления раны в опытной группе существенно превышает аналогичные показатели ($p < 0,01$) в группе сравнения. Применение комплексного препарата оказало выраженное стимулирующее влияние на динамику планиметрических показателей экспериментальной гнойной раны у животных опытной группы. Использование разработанного препарата оказало выраженное влияние на регенерацию раны во все сроки проведения контрольных измерений, к 10-м суткам исследования в опытной группе наблюдалось полное заживления раны, в группе сравнения на 5-е сутки площадь раны уменьшилась на 47,4% по сравнению с исходной.

Также изучены суточное изменение площади ран (в%), скорость заживления ран (в мм²/сут). Различия между опытной группой и группой сравнения при анализе этих показателей было достоверно ($p < 0,01$) на всех сроках наблюдения, что доказывает регенеративную активность комплексного порошкообразного препарата.

Таблица 1

Изменение площади поверхности экспериментальной гнойной раны при лечении комплексным препаратом на основе наночастиц серебра и меди

Сутки	Площадь раны у экспериментальных животных, М, мм ²	
	Группа сравнения, n=20	Опытная группа, n = 20
3-и	591,1 ± 20,8	593,7 ± 32,0
5-ые	632,7 ± 19,8	251,5 ± 11,3*** $p < 0,001$
7-ые	487,9 ± 17,5	89,4 ± 5,8*** $p < 0,001$
10-ые	387,7 ± 11,5	Полное заживление
14-е	216,5 ± 9,3	Полное заживление

Примечание. p – уровень достоверности различий показателей по отношению к группе сравнения.

Таблица 2

Количественное определение *Candida albicans* на 1 г ткани у экспериментальных животных различных групп (КОЕ/г, М ± m)

Серии экспериментов	Количество КОЕ/г <i>C. albicans</i>			
	3-и сутки	5-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
Группа сравнения, n = 20	$(5,2 \pm 1,0) \times 10^6$	$(2,1 \pm 2,1) \times 10^8$	$(2,4 \pm 1,7) \times 10^5$	$(7,3 \pm 3,0) \times 10^5$
Опытная группа, n = 20	$(5,0 \pm 0,8) \times 10^6$ p > 0,05	$(2,3 \pm 2,5) \times 10^3$ p < 0,001	$(3,8 \pm 4,9) \times 10^2$ p < 0,001	роста нет

Примечание. p – уровень достоверности различий показателей по отношению к группе сравнения.

Изучена бактериальная обсемененность экспериментальной раны в группе сравнения и опытной группе. Высокая антибактериальная активность наночастиц меди в отношении клинических штаммов *S. aureus* неоднократно доказана в наших предыдущих работах, а состав данного препарата дополнен компонентами, оказывающими антимикотическое действие, поэтому более подробные количественные данные приводим в отношении обсемененности раны клиническим штаммом *C. albicans*.

Количественная обсемененность экспериментальной раны грибами рода *Candida* (КОЕ/г, М ± m) представлена в табл. 2.

Применение комплексного порошкообразного препарата вызывало за короткий срок уничтожение контаминирующих рану возбудителей, в том числе грибов рода *Candida*, что является необходимым условием репаративной регенерации и заживления экспериментальной раны. На 5-е сутки наблюдения в опытной группе отмечали статистически достоверное снижение обсемененности раны грибами рода *Candida* до 10^3 КОЕ/г. При применении комплексного препарата культура золотистого стафилококка высевалась до 5-х суток наблюдения, в группе сравнения – до 14 дня. К 14-м суткам наблюдения у животных опытной группы наблюдалась полная элиминация контаминирующих возбудителей и заживление раны. У животных группы сравнения до 14-х суток высевался *S. aureus*, площадь раны к 14-м суткам сократилась на 47% от исходной.

В раневом экссудате 4-х животных группы сравнения на 5-е сутки идентифицировали *E. coli* в количестве 3×10^3 КОЕ/мл, помимо сохранения *C. albicans* и *S. aureus* в клинически значимом количестве, края и дно раны – гиперемированы и отечны. Таким образом, произошло вторичное инфицирование раны, приводящее к увеличению раневой поверхности. У всех животных опытной группы, получавших лечение комплексным порошкообразным препаратом,

происходило динамичное заживление экспериментальной раны на фоне отсутствия вторичного инфицирования раны.

Задачей разработки комплексного порошкообразного препарата было расширение спектра лечебного действия, в том числе, возможность применения для ран с обильной экссудацией, инфицированных не только грамотрицательными и грамположительными бактериями, но и грибами, а также их ассоциатами с бактериями за счет добавления оксида цинка, обладающего антимикотическим и выраженным дренирующим и сорбирующим действием. Использование препарата, состоящего из комплекса веществ, сочетающих положительные свойства нескольких типов, позволило решить разнонаправленные задачи, воздействуя на различные звенья патогенеза, обеспечив эффективность применения данной композиции на всех стадиях раневого процесса.

Применение препарата для местного лечения гнойно-воспалительных осложнений в послеоперационном периоде, трофических язв, инфицированных ожогов является этиологически и патогенетически оправданным, благодаря его активности при высоком уровне бактериальной контаминации антибиотикорезистентными грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами и грибами рода *Candida*, а также их ассоциатами, учитывая также, что течение раневого процесса в этих случаях характеризуется обильной экссудацией.

Компоненты предлагаемого комплексного препарата проявляют синергизм в отношении высокорезистентных госпитальных штаммов микроорганизмов. Наиболее важной является способность препарата создавать высокие бактерицидные концентрации наночастиц меди и серебра в гнойном очаге, не оказывая системного влияния. При лечении ран комплексным препаратом в короткий срок достигается полная эрадикация патогенных возбудителей и надежная профилактика реинфицирования раневой поверхности без общей антимикробной терапии.

Разработанный препарат на основе наночастиц меди и серебра оказывают выработанное стимулирующее действие на репаративную регенерацию мягких тканей и может быть использован при разных типах повреждений покровных тканей. Разработанный препарат для местного лечения гнойных ран на всех этапах раневого процесса позволяет сократить сроки или полностью отказаться от применения антибиотиков, избежать развития побочных реакций, избежать селекции антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов.

Список литературы

1. Бабушкина И.В. Этиологическая роль возбудителей хронического остеомиелита и влияние наночастиц металлов на клинические штаммы *Staphylococcus aureus*/ Бабушкина И.В., Мамонова И.А., Гладкова Е.В. Вестник Пермского университета. Серия: Биология. 2014, выпуск 2, С. 52-56.
2. Букина, Ю.А. Антибактериальные свойства и механизм бактерицидного действия наночастиц серебра / Ю.А. Букина, Е.А. Сергеева // Вестник Казанского Технологического университета. – 2012. – № 14. – С. 170-172.
3. Богословская О.А. Сравнительное исследование ранозаживляющего действия веществ различной природы / О.А. Богословская, Т.А. Лобаева, Т.А. Байтукалов [и др.] // Естественные и технические науки. – 2007. – Т. 32, № 6. – С. 91-99.
4. Гостев В.В., Науменко З.С., Мартель И.И. Антибиотикорезистентность микрофлоры ран открытых переломов // Травматология и ортопедия России. – 2010 – Т. 55, № 1. – С. 33-37.
5. Зорин А.Н. Клинический опыт применения препарата баноцин в терапии инфекционных поражений кожи / А.Н. Зорин, Т.Н. Гузей // Клиническая дерматология и венерология. – 2005. – № 1. С. 65-67.
6. Antimicrobial effects of silver nanoparticles / J.S. Kim, E. Kuk, K.N. Yu [et al.] // Nanomedicine. – 2007. – V. 3, Issue 1. – P. 95-101.
7. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria / H.H. Lara, V.A. Nilda, L.C.I. Turrent, C.R. Padilla // World J Microbiol Biotechnol. – 2010. – V. 26, Issue 4. – P. 615–621.
8. Egorova E.M, Revina A.A. Synthesis of metallic nanoparticles in reverse micelles in the presence of quercetin. // Colloids and Surfaces. A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2000. Vol. 168. P. 87-96.