

ВОЗМОЖНОСТЬ РЕПАРАЦИИ МЯГКИХ ТКАНЕЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГНОЙНОЙ РАНЫ

С. В. Белова, И. В. Бабушкина, Е. В. Гладкова, И. А. Мамонова¹

Изучена эффективность применения нового комплексного препарата, содержащего в качестве активных компонентов наночастицы меди и серебра, а в качестве основы — крахмал в соотношении составляющих компонентов, масс. %: наночастицы меди — 0,05 – 0,07; наночастицы серебра — 0,03 – 0,05; крахмал — остальное, у животных с экспериментальной полнослойной гнойной раной. При местном нанесении комплексного препарата на 5, 7, 9 сут эксперимента равномерным слоем в количестве 0,3 г/животное отмечалось выраженное уменьшение площади ран во все контрольные сроки наблюдения, в отличие от показателей группы сравнения, по данным планиметрического исследования. В сыворотке крови крыс отметили статистически достоверное ($p < 0,001$) понижение содержания малонового диальдегида на 23 % и повышение активности сывороточного ферментного антиоксиданта церулоплазмينا на 20,5 %, по сравнению с аналогичными показателями у животных до лечения, что свидетельствовало о снижении интенсивности процессов перекисного окисления липидов и о повышении активности антиоксидантной системы. Разработанный комплексный препарат оказывал положительное действие на репаративные процессы мягких тканей, а также на состояние процессов перекисного окисления липидов и активность антиоксидантной системы.

Ключевые слова: экспериментальная гнойная рана; крысы; комплексный препарат; репарация; наночастицы меди и серебра.

ВВЕДЕНИЕ

Традиционные методы профилактики и лечения раневой инфекции с помощью антибиотиков не всегда эффективны из-за антибиотикоустойчивости многих штаммов патогенов [14].

В качестве перспективных компонентов нового класса антибактериальных средств могут выступать наночастицы металлов [16]. В настоящее время в литературе широко представлены данные по изучению биологической активности наночастиц серебра [3] и меди [9, 17], при этом медь участвует в антиоксидантной защите организма, являясь структурным компонентом ферментного антиоксиданта — церулоплазмينا [2, 6]. Не требует доказательств положение о важной роли процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы организма в патогенезе гнойной раны [15].

Антибактериальные свойства наночастиц металлов дают возможность их использования в лечении гнойно-воспалительных процессов [1]. В клинической практике используются препараты в виде порошка, в отличие от регенерирующих и антибактериальных кремов и мазей, они не создают плёнки на ране, что обеспечивает свободный доступ кислорода к повреждённым клеткам тканей, ускоряя естественные процессы заживления ран. В связи с этим для подавления раневой микрофлоры и ускорения регенерации кожи

перспективна разработка нового комплексного препарата — порошка с наночастицами меди и серебра, что, возможно, позволит обеспечить высокую антимикробную активность, значительно уменьшить вероятность развития гнойных осложнений и ускорить процесс репарации.

Цель работы заключалась в разработке нового комплексного препарата и оценке его эффективности у животных с экспериментальной полнослойной гнойной раной.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные исследования выполняли на 38 беспородных крысах массой 190 – 230 г (питомник Саратовского государственного аграрного университета им. Н. И. Вавилова). Модель гнойной раны сформирована в межлопаточной области спины крысы под наркозом с помощью вырезания небольшого (15 × 15 мм) участка кожного лоскута с подкожной клетчаткой, при этом дно и края раны раздавливали зажимом Кохера. Для инфицирования раны помещали в нее марлевый тампон с взвесью суточной культуры *St. aureus*, выделенной от больных с остеомиелитом и другими гнойными посттравматическими и послеоперационными осложнениями, в дозе $2 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Развитие типичной картины полнослойной раны с признаками гнойного воспаления фиксировалось на 5 сут. Моделирование раны проводили под анестезией с помощью препарата “Zoletil 50” компании “Virbac” (Франция), предназначенного для общей анестезии животных.

¹ ФГБУ “Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии” Минздрава России, Россия, 410002, Саратов, ул. им. Н. Г. Чернышевского, 148.

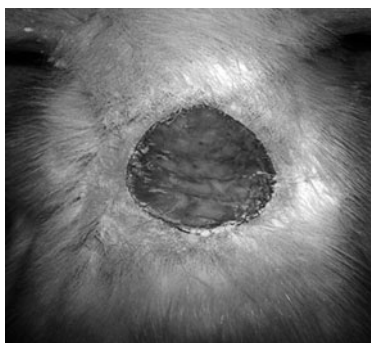


Рис. 1. Состояние раны крысы на 5 сут эксперимента.

В работе использовали комплексный препарат в форме порошка, содержащего в качестве активных компонентов наночастицы меди и серебра, а в качестве основы — крахмал в определенном соотношении составляющих, масс. %: наночастицы меди — 0,05 – 0,07; наночастицы серебра — 0,03 – 0,05; крахмал — остальное. Дисперсность используемых наночастиц металлов, полученных плазмохимическим методом, составляла 60 – 80 нм у меди и 25 нм у серебра. Препарат наносили на рану на 5, 7, 9 сут эксперимента равномерным слоем в количестве 0,3 г/животное.

Экспериментальные животные распределялись следующим образом: контрольную группу составили 8 интактных крыс, которые были выведены из эксперимента после забора крови для получения нормальных величин; у 30 крыс сформирована полнослойная гнойная рана; на 5 сут с начала эксперимента (сроки формирования раны) у 10 животных произведен забор крови, и они были выведены из эксперимента; оставшиеся 20 животных разделены на опытную группу, в которой 10 крыс пролечены новым разработанным препаратом, и группу сравнения, где 10 крысам на рану наносили крахмальный порошок в количестве 0,3 г/животное.

Содержание животных в виварии, их питание и уход за ними проводили согласно “Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) от 06.04.1973”. Выведение животных из эксперимента осуществляли согласно “Правил проведения работ с

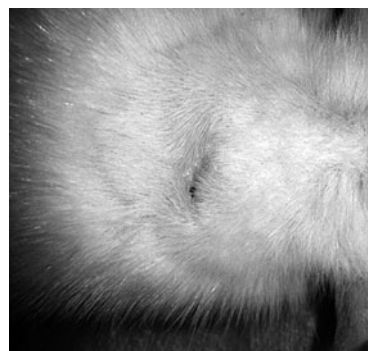


Рис. 2. Состояние раны крысы из опытной группы на 12 сут эксперимента.

использованием экспериментальных животных” (приложение 3, 4 к приказу Минздрава СССР от 12.08.1977, № 755), протокол № 4 локального этического комитета ФГБУ “СарНИИТО” Минздрава РФ от 23 декабря 2014 г.

Характер течения раневого процесса и эффективность действия препарата оценивали с помощью планиметрического метода исследования, основанного на регистрации скорости уменьшения раневой поверхности во времени [11]. При этом анализировали наличие и характер воспалительной реакции, состояние краев и дна раны, сроки эпителизации и очищения раны от некротических тканей и появление грануляций и их характер. Оценку планиметрических характеристик осуществляли на 5, 7, 10, 12 сут.

Изучали процессы перекисного окисления липидов и состояние антиоксидантной системы. В качестве маркера процессов перекисного окисления липидов использовали определение уровня малонового диальдегида в мкмоль/л [7]. Состояние антиоксидантной системы оценивали по активности внеклеточного ферментного антиоксиданта церулоплазмينا в сыворотке крови, выражая ее в условных единицах согласно рекомендациям В. П. Пишак, Г. М. Ярмольчук (1998) [8, 10].

Забор крови проводили путем пункции сердечной мышцы вакуумным способом. Сыворотку крови получали при центрифугировании в течение 10 мин при 3 тыс оборотах в мин.

Лабораторные показатели у экспериментальных животных

Показатель	Интактные крысы (n = 8)	Крысы со сформированной раной до лечения (n = 10)	Крысы опытной группы после лечения (n = 10)	Крысы группы сравнения (n = 10)
Малоновый диальдегид, мкмоль/л	2,84 ± 0,17	4,07 ± 0,20 <i>p</i> < 0,001	3,16 ± 0,12 <i>p</i> ₁ < 0,001	4,86 ± 0,32 <i>p</i> < 0,001 <i>p</i> ₁ < 0,05 <i>p</i> ₂ < 0,001
Церулоплазмин, у. е.	26,12 ± 0,50	19,15 ± 0,59 <i>p</i> < 0,001	23,08 ± 0,72 <i>p</i> < 0,001 <i>p</i> ₁ < 0,001	17,42 ± 0,45 <i>p</i> < 0,001 <i>p</i> ₁ < 0,05 <i>p</i> ₂ < 0,001

p — достоверно по отношению к данным контрольной группы; *p*₁ — достоверно по отношению к данным животных со сформированной раной до лечения; *p*₂ — достоверно по отношению к данным опытной группы после лечения.



Рис. 3. Состояние раны крысы из группы сравнения на 12 сут эксперимента.

Все лабораторные исследования проводились в динамике: до формирования раны ($n = 8$), на 5 ($n = 10$), 12 ($n = 20$) сут эксперимента.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы “Medstat”, предназначенной для обработки результатов медицинских и биологических наблюдений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У всех животных после завершения формирования полнослойной гнойной раны при визуальном осмотре наблюдалась гиперемия, отечность краев и дна раны. К концу 5 сут на раневой поверхности отмечалось появление экссудата (рис. 1), у 2 животных имелось скудное гнойное отделяемое, а у одного — появление очагов некроза.

Проведенное бактериологическое исследование показало контаминацию раны *St. aureus* в количестве $3 \cdot 10^7 - 8 \cdot 10^9$ КОЕ/мл у животных с экспериментальной раной.

При исследовании процессов перекисного окисления липидов определено статистически достоверное ($p < 0,001$) повышение уровня малонового диальдегида по сравнению с интактными животными, кроме того, отмечено статистически достоверное ($p < 0,001$) снижение активности ферментного антиоксиданта церулоплазмينا по сравнению с показателями у интактных крыс (таблица). Выявленные изменения свидетельствовали об активации процессов перекисного окисления липидов и несостоятельности антиоксидантной системы на 5 сут с момента формирования раны.

Животные со сформированной полнослойной раной на 5 сут наблюдения разделены на группу сравнения и опытную группу, в которой на поверхность экспериментальной раны нанесен изучаемый препарат.

На 7 сут после формирования раны и второго нанесения препарата наблюдались позитивные ее изменения, а именно: формирование раневого струпа ровной окантовки, уменьшение площади поверхности раны, отсутствие раневого экссудата при сравнении с группой животных без нанесения препарата.

На 12 сут у 9 особей опытной группы происходила полная эпителизация и равномерное заживление раны. Кроме того, у некоторых животных этой группы восстанавливался волосяной покров в области заживления (рис. 2).

У животных группы сравнения в те же сроки наблюдалась несколько иная картина. Положительная динамика заживления раневого процесса была менее выраженной, чем в опытной группе. У некоторых представителей данной группы вокруг раны на коже имелась гиперемия, кроме того, отмечалось отсутствие верхних слоев кожи с местами отторжения струпа, полной эпителизации раны не отмечалось (рис. 3).

При биохимическом исследовании крови у крыс опытной группы к концу 12 сут обнаружено статистически достоверное ($p < 0,001$) понижение содержания малонового диальдегида и повышение активности сывороточного ферментного антиоксиданта церулоплазмينا по сравнению с аналогичными показателями у животных группы сравнения (таблица). Описанные явления свидетельствовали о снижении интенсификации процессов перекисного окисления липидов и о повышении активности антиоксидантной системы при применении комплексного препарата. В группе сравнения у животных в те же сроки, что и в опытной группе, оставалось повышенным содержание малонового диальдегида и снижена активность церулоплазмينا в сыворотке крови (таблица), что отражало негативные изменения процессов перекисного окисления липидов и состояния антиоксидантной системы организма.

Включение в комплексный препарат наночастиц серебра и меди оправдано их химико-биологическими свойствами. Полученные данные об эффективности предлагаемого препарата согласуются с результатами других авторов в отношении наночастиц серебра, которые использовались в составе метилурациловой мази в эксперименте на морских свинках-альбиносах и оказывали положительное действие на проявления окислительного стресса и иммуносупрессии, вызванные ультрафиолетовым облучением [5]. В другом исследовании показана способность наночастиц серебра вызывать активную мобилизацию фагоцитирующих клеток с преобладанием нейтрофильных лейкоцитов при интратрахеальном введении [12].

Выбор формы лекарственных средств местного применения должен проводиться клиницистами с учетом степени распространения патологического процесса, стадии заболевания, характера и глубины воспалительного процесса [4]. В клинической практике для лечения ран с обильной экссудацией целесообразным является применение лекарственного средства в виде присыпки, представляющей собой порошки, терапевтический эффект которых зависит от степени дисперсности активных компонентов [13]. Вспомогательный компонент предлагаемого препарата, как и других аналогичных препаратов, обладает свойством активной абсорбции крови и раневого экссудата. Дан-

ный порошкообразный препарат не создаёт плёнки на раневой поверхности, тем самым обеспечивая свободный доступ кислорода к повреждённым тканям, что способствует ускорению процессов заживления ран. Таким образом, предлагаемый комплексный препарат за счет свойств компонентов, входящих в его состав, обеспечивает эффективное лечение гнойных ран, препятствуя развитию возможной раневой инфекции.

ВЫВОД

Комплексный препарат в виде порошка, содержащего в качестве активных компонентов наночастицы меди и серебра, а в качестве основы – крахмал в соотношении составляющих компонентов, масс. %: наночастицы меди — 0,05 – 0,07; наночастицы серебра — 0,03 – 0,05; крахмал — остальное, при местном равномерном нанесении в количестве 0,3 г/животное на 5, 7, 9 сут эксперимента оказывал положительное действие на репаративные процессы мягких тканей, а также на состояние процессов перекисного окисления липидов (статистически достоверное ($p < 0,001$) понижение содержания малонового диальдегида на 23 %) и активность антиоксидантной системы (статистически достоверное ($p < 0,001$) повышение активности сывороточного ферментного антиоксиданта церулоплазмينا на 20,5 %), по сравнению с аналогичными показателями у животных до лечения в условиях экспериментальной гнойной раны.

ЛИТЕРАТУРА

1. И. В. Бабушкина, И. А. Мамонова, Е. В. Гладкова, *Вестник Пермского университета. Сер.: Биол.*, № 2, 52 – 56 (2014).

2. С. В. Белова, Е. В. Карякина, *Успехи совр. биол.*, **130**(2), 180 – 189 (2010).
3. Н. Н. Беляева, З. М. Гасимова, Р. И. Михайлова и др., *Гигиена и санитария*, № 1, 50 – 54 (2014).
4. Л. И. Богданец, С. С. Березина, Е. Б. Гельфанд, *Инфекции в хирургии*, **5**(2), 39 – 42 (2007).
5. Т. В. Звягинцева, В. В. Гринь, С. И. Миронченко, *Совр. наукоемкие технологии*, № 3, 153 – 152 (2014).
6. Е. В. Карякина, С. В. Белова, В. И. Горячев, *Церулоплазмин — фермент крови и лекарство*, Научная книга, Саратов (2006).
7. В. Г. Колб, В. С. Камышников, *Клиническая биохимия (пособие для врачей-лаборантов)*, Минск (1976).
8. Э. Н. Коробейникова, *Лаб. дело*, № 7, 8 – 10 (1989).
9. И. А. Мамонова, М. Д. Матасов, И. В. Бабушкина и др., *Рос. нанотехнологии*, **8**(5 – 6), 25 – 29 (2013).
10. В. П. Пишак, Г. М. Ярмольчук, *Клин. лаб. диагностика*, № 4, 35 – 36 (1998).
11. Л. Н. Попова, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Воронеж (1942).
12. Л. И. Привалова, М. П. Сутункова, С. В. Пичугова и др., *Медицина труда и пром. экология*, № 11, 42 – 46 (2012).
13. О. А. Питуло, Д. В. Прохоров, М. Б. Испирьян, *Український ж. дерматол., венерол., косметол.*, № 2, 62 – 64 (2008).
14. Б. М. Рахимов, О. А. Коровин, *Мед. вестник Башкортостана*, **8**(6), 197 – 199 (2013).
15. П. А. Руденко, *Вісник ДАУ*, **2**(19), 245 – 250 (2007).
16. J. G. Leid, A. J. Dittoet, A. Knapp, et al., *J. Antimicrob. Chemother.*, **67**(1), 138 – 148 (2012).
17. J. Remyadevi, K. Jeyasubramanian, A. Marikan, et al., *Materials Let.*, **71**, 114 – 116 (2012).

Поступила 30.03.16

SOFT TISSUE REPAIR UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL SEPTIC WOUND

S. V. Belova, I. V. Babushkina, E. V. Gladkova, and I. A. Mamonova

Saratov Institute of Traumatology and Orthopedics, Ministry of Public Health of the Russian Federation, ul. Chernyshevskogo 148, Saratov, 410002 Russia

The effectiveness of a new complex preparation based on starch containing active copper (0.05 – 0.07 mass %) and silver 0.03 – 0.05 mass %) nanoparticles was studied in animals with experimental full-flap septic wounds. Localized application of complex preparation (0.3 g per animal) by uniform layer on 5th, 7th, and 9th day upon wound induction led to significant reduction in wound surface (according to planimetric analysis) at all control periods, in contrast to reference group. There was statistically significant ($p < 0.001$) decrease in malondialdehyde (by 23%) and increase of serum enzymatic antioxidant ceruloplasmin activity (by 20.5%) in rat blood serum compared to the corresponding indexes in animals before therapy. These results are indicative of the suppression of peroxidation processes and stimulation of antioxidant system. The complex preparation exhibited positive influence on soft tissue repair processes, lipid peroxidation processes, and activity of the antioxidant system.

Keywords: experimental septic wound; rats; complex drug preparation; tissue repair; copper and silver nanoparticles.