

ЕНЬЧЕВА ЮЛИЯ АБЫТАЛИНОВНА

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМБИНИРОВАННОГО ХИРУРГИЧЕСКОГО
ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВ III СТЕПЕНИ**

14.01.17 – хирургия
03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Пермь 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители: доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей хирургии № 1 ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России

Самарцев Владимир Аркадьевич

доктор медицинских наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии с курсом КЛД ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, ведущий научный сотрудник ЛММБ Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН

Кузнецова Марина Валентиновна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения острых термических поражений Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательского института скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»

Спиридонова Тамара Георгиевна

доктор медицинских наук, начальник отделения препаратов бактериотерапии филиала ФГУП «НПО Микроген» Минздрава России «Пермское НПО Биомед»

Несчисляев Валерий Александрович

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита диссертации состоится « » мая 2017 г. в часов на заседании диссертационного совета Д 208.067.03 при ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России по адресу: 614990 г. Пермь, ул. Петропавловская, 26

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России по адресу: г. Пермь, ул. Петропавловская, 26; с авторефератом - на сайте университета www.psmu.ru и www.vak.ed.gov.ru

Автореферат разослан « » марта 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Малютина Наталья Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Ожоговая травма представляет серьезную проблему в здравоохранении всего мира и является одной из основных причин заболеваемости с длительной госпитализацией (Лафи, 2014; Maan et al., 2014; Wolf et al., 2016). Гибель кожных покровов сопровождается потерей белков, электролитов, развитием раневой инфекции, что требует скорейшего восстановления защитного барьера (Власов, 2010; Сычевский, 2010; Смирнов и соавт., 2013; Спиридонова и соавт., 2014). При ожогах III степени основная роль отводится активной хирургической тактике, которая заключается в удалении некротических тканей и раннем пластическом закрытии дефекта. В повседневную практику активно внедряются аппаратные методы обработки и лечения ран различной этиологии: ультразвуковая кавитация, вакуумная терапия ран, аргоноплазменная коагуляция и гидрохирургия (Бобровников и соавт., 2013; Аганина и соавт., 2013; Алексеев, 2014; Воробьев и соавт., 2014). В настоящее время гидрохирургическая система успешно применяется в гнойной хирургии (Брегадзе и соавт., 2014; Иванов и соавт., 2014), а также в лечении ожоговых ран у детей и взрослых (Duteille et al., 2012; Hyland et al., 2014; Delli et al., 2015). Тем не менее, критерии активной хирургической тактики с использованием современных гидрохирургических технологий отработаны недостаточно.

Проблема внутрибольничного инфицирования приобретает особую значимость для ожоговых больных: считается, что до 75% всех смертельных случаев после термических ран вызвано инфекционными осложнениями (Питерская, 2009; Лаврентьева и соавт., 2014; Gittings et al., 2016; Yun et al., 2016). Инфицирование раны у больных с термическими травмами происходит чаще всего условно патогенными микроорганизмами, которые обладают устойчивостью к различным группам антибиотиков (Крутиков, 2003; Oncul, 2009; Воробьева, 2010; Гординская и соавт., 2012; Sayaka et al., 2014). Резистентность основных возбудителей ожоговой инфекции к наиболее часто применяемым антибактериальным препаратам может достигать 70-100% (Farshadzadeh, 2014). В ожоговых отделениях видовой спектр возбудителей инфекционных осложнений и их антибиотикочувствительность зависят от климатических и региональных особенностей, от применяемых антибактериальных препаратов, и могут существенно различаться.

Литературные данные о результатах сравнительной оценки эффективности антисептиков при лечении дермальных ожогов неоднозначны, зачастую противоречивы и нуждаются в уточнении (Чмырёв и соавт., 2010; Алексеев и соавт., 2011; Piatkowski et al., 2011; Харитонов и соавт., 2014; Зиновьев и соавт., 2014; Chung et al., 2015; Touzel et al., 2015). Поэтому необходим поиск оптимальных схем применения и ротации антисептиков при глубоких ожогах с учетом микробиологического скрининга.

Степень разработанности темы исследования. Многими авторами показано преимущество хирургической обработки гранулирующих ран в сравнении с традиционной подготовкой к аутодермопластике. Как альтернатива стандартной технике иссечения инфицированных тканей заслуженно принят метод гидрохирургической обработки раны пульсирующей струей (Худяков, 2005; Rennekampff et al., 2006; Barret, 2006; Jeffery, 2007). Однако до сих пор недостаточно отработаны показания к применению гидрохирургической обработки гранулирующих ран с одномоментной аутодермопластикой (Доронина, 2010).

Антимикробная активность ряда традиционных антисептиков по отношению к госпитальным штаммам микроорганизмов в последние годы ставится под сомнение (Гаврилова и соавт., 2011). Накапливаются сведения о цитотоксическом действии

хлоргексидина биглюконата и его неэффективности при воспалительных процессах, ассоциированных с биопленками (Зверьков и соавт., 2013). Новые данные способствовали созданию комбинированных лечебных средств, действие которых связано не только с бактерицидным эффектом на микроорганизмы, но и с разрушением их биопленочной структуры. Изучение влияния биоцидов на клеточный и матриксный компоненты бактериальных биопленок важно с точки зрения понимания механизмов, способствующих их разрушению/удалению, и выработки новых методов лечения инфекционных осложнений, в том числе в ожоговой хирургии. Использование атомно-силовой (АСМ) и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) при решении вопросов, связанных с оценкой морфологических особенностей бактериальных клеток при воздействии различных факторов, в том числе в составе биопленок, является актуальным направлением развития современных методов микробиологического анализа (Pamp et al., 2009; Дерябин и соавт., 2011; Wright et al., 2010; Ерохин 2015).

Цель исследования. Улучшение результатов комбинированного хирургического лечения у больных с глубокими ожогами III степени.

Задачи исследования.

1. Провести сравнительную оценку эффективности методов хирургического лечения глубоких ожогов с использованием традиционной аутодермопластики и современных гидрохирургических технологий с одномоментной аутодермопластикой.
2. Изучить особенности инфицирования и биологические характеристики основных этиопатогенов термических ран в специализированном стационаре.
3. Изучить действие двух антисептических препаратов: хлоргексидина биглюконата и «Пронтосана[®]» на биопленки, сформированные *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, в монокультуре и в ассоциации *in vitro*.
4. Определить показания к применению гидрохирургической обработки гранулирующих ожоговых ран при одномоментной аутодермопластике в сочетании с «Пронтосаном[®]» и разработать алгоритм соответствующего лечения.

Научная новизна работы. Проведено клинико-лабораторное изучение эффективности гидрохирургической обработки гранулирующих ожоговых ран в сочетании с использованием антисептика на основе полигексанида «Пронтосан[®]» с одномоментной кожной пластикой в сравнении с традиционной аутодермопластикой гранулирующих ран. Определены показания к гидрохирургической обработке гранулирующих ожоговых ран с одномоментной кожной пластикой. Усовершенствована методика гидрохирургического лечения обожженных участков кожи с глубокими повреждениями в зависимости от сроков термической травмы, площади ожога и бактериальной обсемененности. Доказана эффективность методов комбинированного хирургического лечения с использованием гидрохирургической системы и антисептика «Пронтосан[®]» по сравнению с традиционным лечением.

Установлены особенности инфицирования термических ран с учетом антибиотикочувствительности и генотипической характеристики доминирующих возбудителей. Впервые с применением атомно-силовой и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии изучены морфометрические показатели смешанной и моновидовых биопленок, образованных *P. aeruginosa* и *S. aureus*, при воздействии антисептиков «Пронтосана[®]» и 0,05% водного раствора хлоргексидина. Показано, что под действием биоцидов в моновидовых биопленках обоих видов бактерий фенотипические

изменения клеток и структурные изменения клеточной поверхности были более выражены при воздействии «Пронтосана®». Установлено, что «Пронтосан®» полностью подавлял жизнеспособность бактерий, как в бинарной, так и в моновидовых биопленках, тогда как при экспозиции с хлоргексидином в них сохранялись жизнеспособные клетки *P. aeruginosa* и *S. aureus*.

Научно-практическая значимость работы. Активная тактика хирургического лечения глубоких ожогов с применением гидрохирургических технологий обработки гранулирующих ран в сочетании с антисептиком на основе полигексанида с одномоментной кожной пластикой позволяет улучшить результаты лечения обожженных больных, сократить сроки лечения пострадавших с глубокими ожогами, уменьшить частоту местных осложнений в виде лизиса пересаженных аутодермотрансплантатов и генерализации инфекций. Предложен метод обработки гранулирующих ран при обширных ожогах III степени (рационализаторское предложение и №2697 от 19.04.2016), а также предложено использование повязок с ионами серебра для лечения ожогов III степени (рационализаторское предложение №2696 от 19.04.2016). Сформулирован алгоритм лечения ожогов III степени (рационализаторское предложение №2709 от 29.10.2016). Получены данные, характеризующие распространенность и особенности циркуляции штаммов *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* в ожоговом отделении.

Оценены выживаемость и морфометрическая реакция бактериальных клеток *S. aureus* и *P. aeruginosa* при воздействии хлоргексидина и «Пронтосана®» в моновидовых и смешанных биопленках. Предложен способ оценки антибактериального действия антисептика на полимикробные биопленки по изменению показателя массивности биопленок и жизнеспособности входящих в их состав бактерий (приоритетная справка на изобретение №2016122539 от 07.06.2016).

Положения, выносимые на защиту.

1. Гидрохирургическая обработка гранулирующих ожоговых ран в сочетании с одномоментной аутодермопластикой и использованием в послеоперационном периоде «Пронтосана®» является эффективным методом хирургического лечения глубоких ожогов на основании клинических и микробиологических критериев.
2. При обширных термических поражениях более 10% поверхности тела целесообразно поэтапно производить гидрохирургическую обработку гранулирующих ожоговых ран в соответствии с площадью планируемой аутодермопластики.
3. Характерными особенностями инфекционных осложнений в ожоговой хирургии являются: доминирование представителей *S. aureus* и *P. aeruginosa* на протяжении длительного времени; возрастающая роль полирезистентных *Acinetobacter baumannii*; замедленная элиминация возбудителей из раны; развитие смешанной и суперинфекции.
4. Негативное влияние антисептиков, 0,05% раствора хлоргексидина биглюконата и «Пронтосана®» на sessильные формы бактерий *S. aureus* и *P. aeruginosa* в смешанном и моновидовых вариантах выражается в полиморфизме клеток и потере их жизнеспособности, а также в дезорганизации поверхностных клеточных структур. Выявленные эффекты более выражены после экспозиции бактериальных биопленок с «Пронтосаном®».

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе 6 статей в журналах из списка ВАК. Материал и основные положения работы доложены и обсуждены на научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы современной медицины» в рамках 18-ой и 21 международной

выставки «Медицина и здоровье» (Пермь, 2012, 2015), на краевой научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной хирургии» (Пермь, 2013), международной научно-практической конференции «Хирургическая обработка ран и гнойно-некротических очагов у детей и взрослых» (Москва, 2014), II Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Современные проблемы микробиологии, иммунологии и биотехнологии» в рамках Пермского научного форума (Пермь, 2015), научной сессии молодых ученых «Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера», посвященной 100-летию высшего медицинского образования на Урале (Пермь, 2016), I Съезде хирургов Приволжского федерального округа (Н.-Новгород, 2016).

Связь работы с научными программами. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» МЗ РФ, на кафедре общей хирургии №1, на кафедре микробиологии и вирусологии с курсом клинической лабораторной диагностики. Номер государственной регистрации 115031920001.

Внедрение результатов исследования. Разработанные показания к гидрохирургической обработке гранулирующих ожоговых ран с последующей одномоментной аутодермопластикой внедрены в практику и используются в ожоговом отделении ГБУЗ ПК «Городская клиническая больница №21» г. Перми, а также в отделении гнойной хирургии ГБУЗ ПК «Городской клинической больницы №2 имени Ф.Х. Граля», включены в лекционный курс на кафедрах общей хирургии №1 и хирургии ФДПО ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» МЗ РФ.

Личный вклад автора в исследование. При планировании, организации и проведении исследований по всем разделам работы доля личного участия автора составляла не менее 80%. Автору принадлежит формулирование проблемы, постановка цели, задач и дизайна исследования, анализ фактического материала и обобщение результатов, подготовка научных публикаций.

Объем и структура работы. Работа изложена на 135 страницах машинописного текста, содержит 16 рисунков и 32 таблицы, состоит из введения, обзора литературы, трех глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Список литературы включает 250 наименований работ, в том числе 128 отечественных и 122 зарубежных авторов.

Автор благодарит за предоставленную возможность и содействие сотрудников и зав. лабораторией алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН: академика РАН, д.б.н., профессора Ившину И.Б., к.б.н. Рубцову Е.В., а также зав. кафедрой микробиологии и вирусологии с курсом КЛД ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» МЗ РФ д.м.н., профессора Горовица Э.С.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования. В соответствии с поставленными в работе задачами был разработан дизайн исследования (рис. 1).

Клиническая часть работы. Выполнена на кафедре общей хирургии №1 ФГБОУ ВО «ПГМУ имени академика Е.А. Вагнера» МЗ РФ, на базе ожогового отделения ГБУЗ ПК «ГКБ №21». Исследование проводилось с соблюдением требований приказа № 163 (ОСТ 91500.14.0001-2002) МЗ РФ и Хельсинской декларации всемирной медицинской ассоциации. Получено одобрение этического комитета при ФГБОУ ВО «ПГМУ имени академика Е.А.

Вагнера» МЗ РФ (от 24.06.2015). Всего обследовано 139 человек с глубокими ожогами III степени (МКБ–10 T29,3). **Критерии включения:** возраст от 18 и более лет с площадью ожогов III степени, не превышающей 20% поверхности тела (п.т.), полное восстановление кожных покровов. **Критерии исключения:** возраст больных моложе 18 лет, площадь ожогов III степени более 20% п.т., летальные исходы.

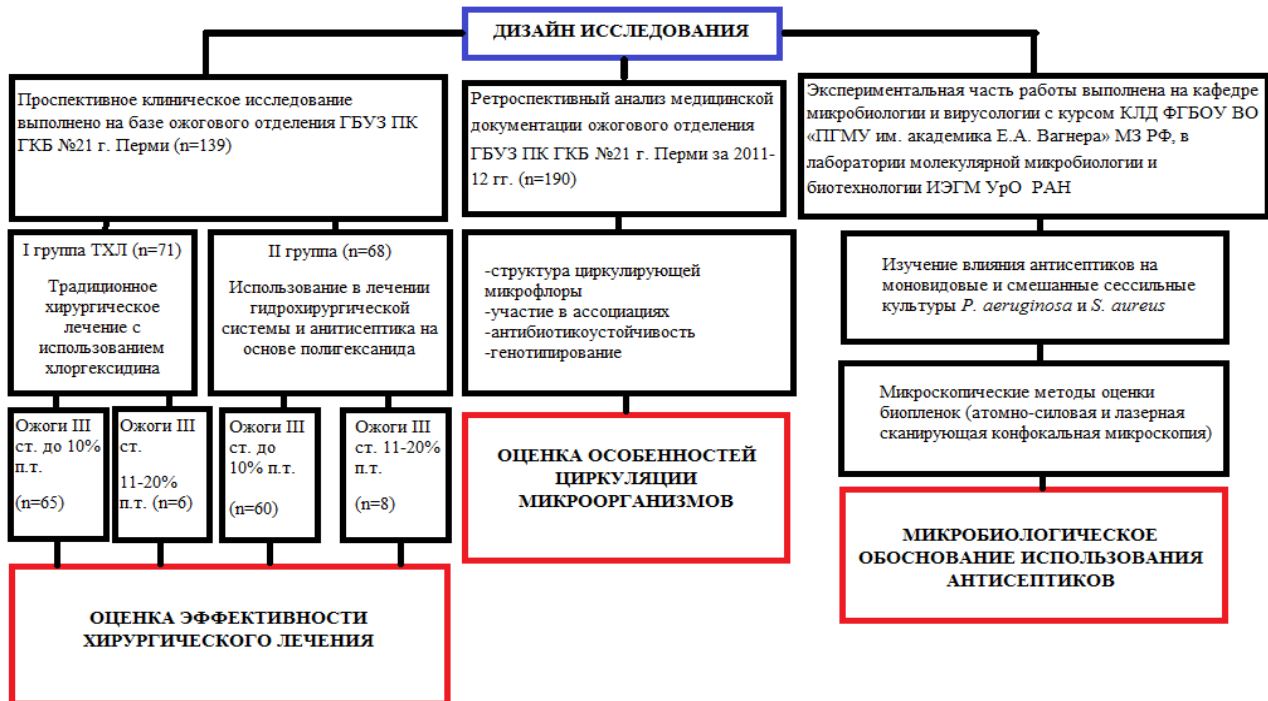


Рис. 1. Дизайн исследования

В первой группе пациентов (n=71) применяли традиционное хирургическое лечение (ТХЛ) с ожиданием подготовки ожоговых ран к аутодермопластике и использованием в послеоперационном периоде 0,05% раствора хлоргексидина. **Вторую группу** (n=68) составили больные, у которых проводилось активное хирургическое лечение в виде гидрохирургической обработки гранулирующих ран (ГХОГР), с одномоментной аутодермопластикой (АДП) и использованием в послеоперационном периоде раствора антисептика на основе полигексанида «Пронтосан®». Для более детального сравнения пациенты каждой группы были разделены на 2 подгруппы, в зависимости от площади ожога: до 10% и 11-20% п.т. С помощью лабораторных методов исследования оценивали бактериальную обсемененность гранулирующих ран до гидрохирургической обработки и на пятый день после проведения АДП с остаточных ран.

Клинические критерии эффективности хирургического лечения. Длительность предоперационной подготовки; срок восстановления кожного покрова (после начала оперативного лечения); длительность стационарного лечения; частота местных послеоперационных осложнений (площадь лизиса трансплантатов в % от площади ран), бактериальная обсемененность в динамике. Эффективность хирургического лечения оценивалась на основании клинических и лабораторных данных. Результат считали хорошим, если лизис аутодермотрансплантатов был не более 5%, удовлетворительным – от 6 до 10%, неудовлетворительным – от 11 до 40%.

Экспериментальная часть работы. Экспериментальная часть работы выполнена на кафедре микробиологии и вирусологии с курсом КЛД ФГБОУ ВО «ПГМУ имени академика Е.А. Вагнера» МЗ РФ и в лаборатории молекулярной микробиологии и

биотехнологии ИЭГМ УрО РАН. Исследования проводили с соблюдением требований приказа № 163 (ОСТ 91500.14.0001-2002).

Бактериальные штаммы. В работе использовали референтные штаммы *S. aureus* ATCC®29213 и *P. aeruginosa* ATCC®27853, полученные из ФГБУ «Государственный институт стандартизации и контроля им. Л.А. Тарасевича» МЗ РФ (Москва), а также клинические изоляты *S. aureus* (n=39) и *P. aeruginosa* (n=12).

Молекулярно-генетические исследования. В течение 2012 г. формировали банк ДНК культур *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*. Тотальную ДНК изолятов *S. aureus* получали методом щелочного лизиса, грамотрицательных бактерий – как описано Stone et al. (1999). **Определение детерминант антибиотикоустойчивости.** Скрининг генов оксациллиназ (ОХА-10 и его производных), металло-бета-лактамаз (*bla_{VM-2}*) и интегронов 1-го класса осуществляли с использованием праймеров, предложенных Danel et al. (1995), Poirel et al. (2000), Gutierrez et al. (2007) и Levesque et al. (1995). **Методы генетического типирования.** Генетическое типирование штаммов осуществляли посредством гер-ПЦР с праймерами ERIC2, BOXA1R и RAPD-ПЦР с праймером M13 (Versalovic, 1991; Wolska et al., 2011 и Huey, Hall, 1989). Амплификацию проводили на термоциклере DNA Engine Dyad Thermal Cycler («Bio-Rad», США). Протоколы ПЦР соответствовали рекомендациям авторов, предложивших используемые праймеры. Визуализацию полос и документирование данных осуществляли с помощью системы гель-документации Gel-Doc XR («Bio-Rad», США). Дендрограммы филогенетического родства штаммов построены с применением компьютерного обеспечения Quantity One (версия 4.6.1, Bio-Rad Laboratories, США).

Эксперименты по изучению влияния антисептиков на моновидовые и смешанные биопленки, сформированные *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Биопленки выращивали на покровных стеклах и в лунках полистиролового планшета. В первом случае оценку морфометрических показателей, шероховатости поверхности биопленки и жизнеспособности клеток в ее составе проводили с помощью АСМ и КЛСМ (окрашивание LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit). Изучение биопленок проводили с помощью комбинированной системы, состоящей из атомно-силового микроскопа (АСМ) Asylum MFP-3D-BIO (Asylum Research, США) и конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ) Olympus FV1000 (Olympus Corporation, Япония), в лаборатории атомно-силовой и конфокальной микроскопии на базе *Rhodococcus*-центра Пермского государственного национального исследовательского университета. Во втором случае биопленки получали согласно O'Toole и Kolter (1998). Биомассу биопленок оценивали по уровню экстракции этанолом 0,1% водного раствора генцианвиолета. Жизнеспособность клеток оценивали после обработки биопленок ультразвуком (Elma Ultrasonic 30S, Германия) по числу колониеобразующих единиц (КОЕ).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием стандартных пакетов компьютерных программ Microsoft Office XP Excel и STATISTICA 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты традиционного хирургического лечения ожогов III степени (n=71). Всего было выполнено 89 операций по пересадке аутодермотрансплантатов. За одну процедуру производилось закрытие ожоговых поверхностей от 1 до 10% п.т., средняя площадь составила $3,5 \pm 1,8\%$ п.т. У 58 (81,6%) пациентов восстановление кожных покровов было выполнено за одно оперативное вмешательство. В 18 случаях потребовалось несколько операций для полного восстановления кожных покровов. Средняя площадь глубоких ожогов

у больных с этапным хирургическим лечением составила $11,8 \pm 3\%$. ТХЛ в среднем проводилось на $26,8 \pm 5,7$ день после поступления и $29,2 \pm 5,6$ сутки после травмы.

Полное восстановление кожного покрова после ТХЛ составило $16,8 \pm 2,6$ суток. Сроки пребывания в стационаре увеличивались пропорционально восстановлению кожного покрова. Длительность стационарного лечения в среднем составила $47,0 \pm 9,6$ дней. Доля лизиса аутодермотрансплантатов в исследуемой группе была 18 (20,2%) случаев. Меньший процент лизиса трансплантатов отмечен в группе с глубокими ожогами, не превышающими 10% п.т., что составило 7,8%. При ожогах III степени 11-20% п.т. частота лизиса увеличилась до 11 эпизодов (12,3%). Тотального и субтотального лизиса трансплантатов в этой группе не наблюдалось.

Бактериальная обсемененность ожоговых ран колебалась в широких пределах от $1,00E+01$ до $1,00E+07$ КОЕ/мл ($n=40$). Средний уровень перед АДП составлял $3,29E+05 \pm 1,46E+05$ КОЕ/мл. На 5 день после оперативного лечения показатель бактериальной обсемененности остаточных ран был $4,46E+04 \pm 1,60E+04$ КОЕ/мл. После АДП у 8 (20%) из 40 пациентов уровень бактериальной обсемененности превысил $1,00E+05$ КОЕ/мл. Уровень бактериальной обсемененности коррелирует с площадью лизиса трансплантатов в % от площади ран. До оперативного лечения в монокультуре в одиннадцати случаях (27,5%) встречалась *P. aeruginosa* и в восьми (20%) – *S. aureus*. Ассоциация *P. aeruginosa* и *S. aureus* отмечена в пяти (12,5%) посевах. На пятый день после ТХЛ в бактериологических посевах остаточных ран доминировали ассоциации *P. aeruginosa* и *S. aureus*, что составило 6 (15%) случаев. Монокультуры *P. aeruginosa* и *S. aureus* отмечены в 5 (12,5%) и 4 (10%) посевах соответственно.

Результаты лечения пациентов с ожогами III степени в группе с гидрохирургической обработкой гранулирующих ран и антисептика на основе полигексанида ($n=68$). Выполнено 76 оперативных вмешательств с применением ГХОГР и использованием в послеоперационном периоде антисептика «Пронтосан®». За одну операцию ГХОГР с одномоментной аутодермопластикой восстановление кожного покрова было достигнуто у 60 (88,2%) пациентов. Два оперативных вмешательства выполнено у 8 (11,8%) пострадавших с ожоговой поверхностью более 10% п.т. Средние сроки для выполнения ГХОГР с последующей АДП от момента получения травмы и от начала поступления в специализированное отделение составили $22,2 \pm 2,6$ и $11,5 \pm 1,6$ суток соответственно.

Средний срок восстановления кожного покрова в группе ГХОГР был $15,6 \pm 3$ дней после первой операции. У пациентов с ожогами до 10% п.т. полная эпителизация была достигнута за $13,9 \pm 0,9$ суток, что оказалось меньше, чем в группе с ожогами 11-20% п.т. $26,5 \pm 1,9$ суток ($p < 0,05$). Среднее время пребывания в стационаре равнялось $27,2 \pm 3,5$ дней. При ожогах 11-20% п.т. время стационарного лечения составило $39,9 \pm 1,8$ суток, что оказалось больше на 14 дней ($25,5 \pm 1,9$) по сравнению с группой пациентов с ожогами до 10% п.т. ($p < 0,05$)

Местные осложнения в виде лизиса аутодермотрансплантатов отмечены в 5 случаях (6,5%) из 76 оперативных вмешательств. Частота случаев лизиса в подгруппе до 10% п.т. составила 3,3%. При обширных глубоких ожогах частота лизиса увеличивалась до 3,9% ($p < 0,05$). Тотального и субтотального лизиса аутодермотрансплантатов не наблюдалось.

У 40 пациентов исследовали бактериальную обсемененность ожоговых ран до и после ГХОГР, а также на 5-ый день после АДП с использованием повязок с раствором «Пронтосан®». Критический уровень микробной обсемененности перед ГХОГР превышал

1,00E+05 КОЕ/мл у 2-х (5%) пациентов, у остальных был в пределах от 1,00E+01 до 1,00E+03 КОЕ/мл. ГХОГР снижала степень бактериальной обсемененности с $2,17E+02 \pm 1,43E+02$ до $1,60E+01 \pm 0,55E+01$ КОЕ/мл. У 35 (87,5%) пациентов сразу после ГХОГР бактериологическое исследование показало отсутствие роста микроорганизмов. В трёх посевах обнаружены бактерии *P. aeruginosa* и по одному *S. aureus* и *A. baumannii* в виде монокультур. Через пять суток после аутодермопластики и использования влажно-высыхающих повязок, пропитанных раствором «Пронтосан®», в 38 пробах роста микроорганизмов выявлено не было.

Эффективность гидрохирургической обработки гранулирующих ожоговых ран с использованием в послеоперационном периоде раствора «Пронтосан®». Для оценки эффективности ГХОГР с использованием в послеоперационном периоде «Пронтосана®» проведен сравнительный анализ результатов аутодермопластики с предшествующим гидрохирургическим лечением и без него.

В группе с ГХОГР эпителизация всех ожоговых ран за одну аутодермопластику была достигнута у 60 (88,2%), а при ТХЛ у 58 (81,6%) пациентов. Остальным пострадавшим проводились оперативные вмешательства в несколько этапов. В группе с ГХОГР у 8 (11,8%) пациентов выполнено по 2 операции. В группе с ТХЛ из 18 пациентов с повторными вмешательствами у 10 человек (14%) АДП осуществлялась в 2 этапа, у 7 (5,6%) – в 3 этапа, а одному пострадавшему потребовалось четыре операции для полного восстановления утраченных кожных покровов.

Средний срок **от момента травмы** до оперативного лечения при ГХОГР у пациентов с ожогами до 10% п.т. был меньше, в среднем, на 6 дней, чем при ТХЛ. При ожогах 11-20% п.т. разница была незначительной и статистически недостоверной. Средний срок **от момента поступления** до оперативного вмешательства в группе с ГХОГР до 10% п.т. составил $11,5 \pm 1,6$ суток, что на десять суток меньше по сравнению с группой ТХЛ, где подготовка занимала $21,2 \pm 4,7$ день ($p=0,0114$). Статистически достоверной оказалась разница и в группе с ожогами 11-20% п.т., которая составила $12,9 \pm 0,7$ и $19,8 \pm 7,1$ суток соответственно. Следует отметить, что в группе с использованием ГХОГР более раннее проведение оперативного лечения связано с тем, что клинической готовности грануляционной ткани для АДП не требовалось. Средний срок **восстановления кожного покрова** после ГХОГР при ожогах менее 10% п.т. был $13,9 \pm 0,9$ суток, в группе с ТХЛ – $15,7 \pm 1,4$ дней. У пациентов с ожогами 11-20% п.т. после ГХОГР средний срок восстановления кожного покрова составил $26,5 \pm 1,9$ дней в сравнении с пациентами с ТХЛ, где эпителизация была достигнута за $27,8 \pm 2,8$ суток ($p < 0,05$). Средний срок **продолжительности стационарного лечения** в группе с ГХОГР был меньше на двадцать суток в сравнении с группой больных, которым проводилось ТХЛ, и составил $27,2 \pm 3,5$ и $47 \pm 9,6$ дней соответственно ($p=0,0059$).

Применение комбинированного подхода в хирургическом лечении позволило достоверно снизить частоту лизиса пересаженных аутодермотрансплантатов с 20,2% при ТХЛ до 6,5% при ГХОГР ($p=0,0117$). Бактериальная обсемененность перед операцией ГХОГР составляла $2,17E+02 \pm 1,43E+02$ КОЕ/мл, тогда как при ТХЛ – была намного выше $4,46E+04 \pm 1,60E+04$ КОЕ/мл. На 5 сутки после АДП в группе, где использовался раствор «Пронтосана®», бактериального роста не наблюдалось. В группе, где применялся раствор хлоргексидина, отмечена тенденция к повышению уровня микробной контаминации. Анализ результатов хирургического лечения при ожогах III степени до 10% п.т. в группах в зависимости от сроков его проведения после получения травмы представлен в Таблице 1.

**Сравнение эффективности различных методов оперативного лечения
в зависимости от сроков после травмы при глубоких ожогах до 10% п.т.**

Критерии	Сроки оперативного лечения после травмы					
	До 20 суток		20-30 суток		Более 30 суток	
	ГХОГР	ТХЛ	ГХОГР	ТХЛ	ГХОГР	ТХЛ
Срок проведения операции (в сутках после травмы)	17,8±0,9	17±1,5	23,4±1,8*	26,2±2,4	31±0,6*	36,3±3,4
Восстановление кожного покрова (в сутках после операции)	14±0,9	15,8±1,2	15,1±2,5	15,9±1,7	13±0,4	15,6±1,1
Количество операций на 1 больного	1	1	1,1±0,1*	1,3±0,4	1	1,04±0,08
Частота лизиса	2,6%*	0%	1,3%*	12,4%	0%*	6,8%

Примечание: * – достоверность статистических различий между показателями ($p < 0,05$).

В группе с ГХОГР отмечено увеличение случаев лизиса, если оперативное лечение проводилось до двадцатых суток после ожоговой травмы, тогда как в группе с ТХЛ этот показатель оказался ниже. Если процедура ГХОГР выполнялась на двадцатый-тридцатый день после получения ожога, то вероятность лизиса аутодермотрансплантатов была меньше чем в группе с ТХЛ и составила 1,3% и 12,4% соответственно. В группе с ГХОГР также шло быстрее восстановление целостности кожного покрова, снижалось количество операций на одного пациента, когда грануляционная ткань не отвечала клиническим критериям готовности ран к АДП. В группе с ТХЛ, наоборот, отмечалось увеличение частоты лизиса трансплантатов и, соответственно, рост числа операций на одного пациента. Применение ГХОГР позднее тридцатых суток после получения травмы приводило к уменьшению сроков эпителизации кожного покрова и отсутствию лизиса аутодермотрансплантатов.

При ожогах до 20% п.т. в первой и второй группах сроки проведения оперативного лечения от момента травмы отличались незначительно (табл. 2). Отмечена тенденция к снижению числа лизиса аутодермотрансплантатов и пропорциональному снижению количества операций в группе с ГХОГР. Наиболее это выражено у пациентов при позднем поступлении в ожоговое отделение. ГХОГР оказалась эффективной процедурой для лечения ожогов III степени площадью 11-20% п.т. при проведении на 20-30 сутки с момента получения ожога. Если грануляционная ткань является патологической с большим количеством фибрина, а микробная обсемененность превышает $1,00E+05$ КОЕ/мл, показана ГХОГР с одномоментной АДП и использованием в послеоперационном периоде антисептика «Пронтосан®». Данный метод хирургического лечения является более эффективным в настоящий период, что позволяет сократить частоту осложнений в виде лизиса кожных трансплантатов, а также снижает число повторных операций. Совокупность свойств такого метода лечения улучшает приживляемость трансплантатов, воздействуя на восприимчивость раневой поверхности, что отражается и на результатах проведенной АДП. В случае грануляций, отвечающих клиническим критериям готовности, гидрохирургическое иссечение на 20-30 сутки после получения ожоговой травмы не показано.

**Сравнение эффективности различных методов оперативного лечения
в зависимости от сроков после травмы при глубоких ожогах 11-20% п.т.**

Критерии	Сроки оперативного лечения после травмы					
	До 20 суток		20-30 суток		Более 30 суток	
	ГХОГР	ТХЛ	ГХОГР	ТХЛ	ГХОГР	ТХЛ
Срок проведения операции (в сутках после травмы)	нет	нет	23,6±0,8	23,2±1,2	нет	44±11
Восстановление кожного покрова (в сутках после операции)	нет	нет	20,6±5,3*	28,7±1,7	нет	26±5
Количество операций на 1 больного	нет	нет	1,5±0,5*	2±0,5	нет	2,5±0,5
Частота лизиса	нет	нет	0%*	2,9%	нет	2,9%

Примечание: * – достоверность статистических различий между показателями ($p < 0,05$).

Применение ГХОГР с последующей АДП позволяет сократить сроки предоперационной подготовки и произвести оперативное лечение в более ранние сроки, чем при ТХЛ, где кожной пластике предшествует длительная подготовка с целью получения клинически готовых к пластическому закрытию ран. Это отражается и на продолжительности стационарного лечения. Наилучшие результаты у пациентов с ожогами до 10% п.т. были получены в группе, где использовалось комбинированное лечение. Но традиционное лечение оказалось наиболее эффективным при выполнении в первые двадцать суток после получения ожоговой травмы, а также, когда грануляции отвечают клиническим критериям готовности к АДП. ГХОГР с одномоментной АДП и использованием в послеоперационном периоде антисептика «Пронтосан®» рекомендуется использовать, когда операция выполняется позднее тридцатых суток после получения ожоговой травмы, а также на двадцатые-тридцатые сутки в случае, когда грануляции не отвечают клиническим критериям готовности к аутодермопластике.

Учитывая, что во время ГХОГР удаляется поверхностный слой грануляционной ткани, где концентрируются бактерии, очевидно уменьшение числа лизиса кожных трансплантатов. Перед проведением АДП необходимо учитывать микробную обсемененность ран. Если бактериальная обсемененность составляет $1,00E+05$ КОЕ/мл и более, это является показанием к ГХОГР с использованием в послеоперационном периоде «Пронтосана®». Низкая бактериальная обсемененность ожоговых ран является основанием для выполнения ТХЛ гранулирующих ожоговых ран.

Таким образом, ГХОГР с последующей одномоментной АДП и использованием в послеоперационном периоде «Пронтосана®» является прогрессивным методом лечения пациентов с ожоговой травмой. Это метод активного хирургического лечения, благодаря которому сокращается период подготовки ран к АДП, снижается продолжительность нахождения в стационаре, улучшается приживляемость кожных трансплантатов. ТХЛ следует применять в случаях, когда АДП выполняется в первые двадцать суток после получения ожога, а также на двадцатый-тридцатый день, когда гранулирующие раны отвечают клиническим критериям готовности к АДП. Полученные в результате проведенного исследования данные позволили предложить алгоритм комбинированного

хирургического лечения ожогов III степени с учетом площади ожогов, сроков, клинической готовности ран и их бактериальной обсемененности (рис. 2).

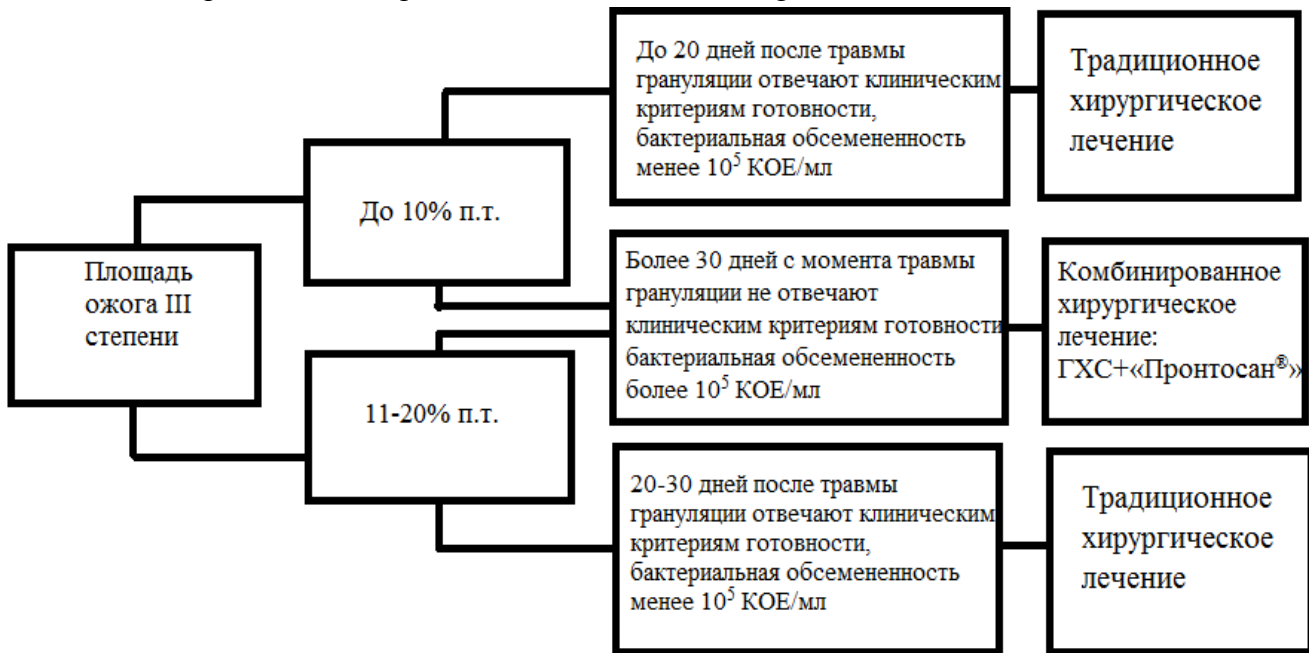


Рис. 2. Алгоритм комбинированного хирургического лечения

Особенности инфицирования ожоговых ран. Всего обобщены результаты микробиологического анализа 208 проб биологического материала. От 190 пациентов (91,3%) было изолировано 270 бактериальных культур. Из них 38 человек находились на лечении по поводу ожогов I-II степени, 152 – III степени. Микробную колонизацию ран регистрировали на $11 \pm 4,1$ и $12 \pm 7,2$ день, соответственно ($p=0,0004$).

Спектр микробиоты оказался весьма разнообразным: выделенные бактерии отнесены к 12 родам и 19 видам с сопоставимым представительством грамположительных (51,5%) и грамотрицательных таксонов (48,5%). Доминирующими видами были *S. aureus* и *P. aeruginosa* – их совокупная доля составила почти 40% от всех выделенных бактерий. Из грамположительных микроорганизмов часто выделяли и других представителей рода *Staphylococcus* – *S. epidermidis* и *S. haemolyticus*, а также *Corynebacterium xerosis*, *Enterococcus faecalis*. Значимыми среди грамотрицательных бактерий были *A. baumannii*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter cloacae*. Два вида – *S. aureus* и *P. aeruginosa* имели показатель постоянства (индекс встречаемости), превышающий 25%, *S. epidermidis* и *A. baumannii* – более 10%, все остальные таксоны отнесены к группе эпизодически встречающихся или случайных. Индекс встречаемости для *S. epidermidis* и *A. baumannii* был выше при поверхностных (18,4 против 10,5% и 15,8 против 11,8%, соответственно), а для *S. haemolyticus* и *Klebsiella* spp. – при глубоких повреждениях (5,3 против 11,2% и 5,3 против 8,6%, соответственно). В монокультуре бактерии высевали в 2 раза чаще, чем в составе ассоциаций, у 66,8 и 33,2% больных соответственно, при этом близкое соотношение сохранялось как при поверхностных, так и при глубоких ожогах. Из 63 случаев микстинфекций в 82,5% выявлены двухкомпонентные ассоциации, как единичные находки отмечены 3-х и 4-х компонентные варианты. Для наиболее значимых этиопатогенов при инфицировании ожоговых ран *S. aureus* и *P. aeruginosa* не выявлено достоверных отличий по частоте встречаемости в моно- или смешанной культуре, тогда как *A. baumannii* достоверно чаще высевали в составе ассоциаций ($\varphi^* = 2,667$; $p=0,01$). Преобладающее большинство ассоциаций *S. aureus* были с *Enterococcus* spp., а ассоциации *P. aeruginosa* – с другим

неферментирующим микроорганизмом *A. baumannii*. Необходимо отметить, что штаммы *S. aureus* и *P. aeruginosa* изолировали из раневого отделяемого в течение всего года, тогда как *A. baumannii* – спорадически.

Известно, что в процессе лечения ожоговых больных происходит смена или присоединение другого возбудителя, обусловленное длительностью пребывания в стационаре, инвазивными диагностическими и лечебными процедурами, когда возможна вторичная контаминация, в том числе и госпитальными экovarями. Однократная смена возбудителя выявлена у 14-и, двукратная – у 5-и, трехкратная – у одного больного. Наиболее часто при повторных посевах выделяли штаммы *P. aeruginosa* (54,2%) и *S. aureus* (37,5%). Важно подчеркнуть, что микробная контаминация ран при летальных исходах была зарегистрирована лишь в 16,7% случаев. Очевидно, что раневой инфекционный процесс не является основной причиной смерти при ожоговой болезни, но в ряде случаев можно говорить об атрибутивной летальности.

Доля штаммов *S. aureus*, устойчивых к оксациллину (метициллину – MRSA) составила 32,6%. Уменьшение количества MRSA в стационарах ожогового профиля отмечено рядом авторов, которые связывают такое положение с применением других антибактериальных препаратов – ванкомицина и линезолида. К последним были чувствительны все выделенные штаммы золотистого стафилококка. Бета-лактамы антибиотики были не эффективны в отношении более половины изолятов *P. aeruginosa*, исключение составил цефтазидим, к которому сохраняли чувствительность 66% культур. Устойчивость синегнойной палочки к амикацину и цiproфлоксацину оказалась на уровне 40%. Наиболее активным в отношении бактерий данного вида остается имипенем. Большинство выделенных в ожоговом отделении штаммов *A. baumannii* были полирезистентными. Нужно отметить, что у представителей неферментирующих бактерий не обнаружено устойчивости к полимиксину. Оценка спектров антибиотикоустойчивости в динамике позволила предположить, что в ожоговом отделении могут циркулировать госпитальные штаммы *P. aeruginosa* и *A. baumannii*.

Молекулярный скрининг *P. aeruginosa* на присутствие VIM-2-металло-бета-лактамаз, обеспечивающих устойчивость к бета-лактамам антибиотикам, и интегронов I класса не выявил их ни у одного изолята. В геноме штаммов гены *exoU* также не обнаружены, тогда как *exoS* встречался в 68% случаев (у 34 из 50 штаммов). Специфическая амплификация с праймерами ABD1/ABD4 к ферменту OXA-10 и его производным была выявлена у 5 (10%) изолятов *P. aeruginosa*, то есть у некоторых исследованных штаммов, фенотипически устойчивых к одному или ряду бета-лактамов антибиотиков, эта устойчивость была связана, в том числе, и с продукцией оксациллиназ. Отсутствие циркуляции в отделении клона *P. aeruginosa* ST235 (*bla_{VIM2}*, *exoU*), распространение которого выявлено в ОРИТ и ожоговых отделениях ЛПУ на территории России (Эйдельштейн, 2012), характеризует эпидемиологическую ситуацию как благополучную.

С целью выявления генетического разнообразия изолятов было проведено генотипирование *S. aureus* (n=35), *P. aeruginosa* (n=30) и *A. baumannii* (n=13). В результате анализа диаграмм/филогенетических дендрограмм подтверждено предположение о циркуляции госпитальных штаммов в ожоговом отделении, сделанное на основе фенотипических характеристик культур (рис. 3). Идентичные и/или схожие геномоварианты были обнаружены для представителей всех исследованных видов. У *P. aeruginosa* определены две клональные группы – одиннадцать и пять изолятов, у *A. baumannii* шесть из

тринадцати штаммов были близкородственными. У *S. aureus* выявлено больше всего отличных геномвариантов, но семь культур имели сходный гер-генотип.

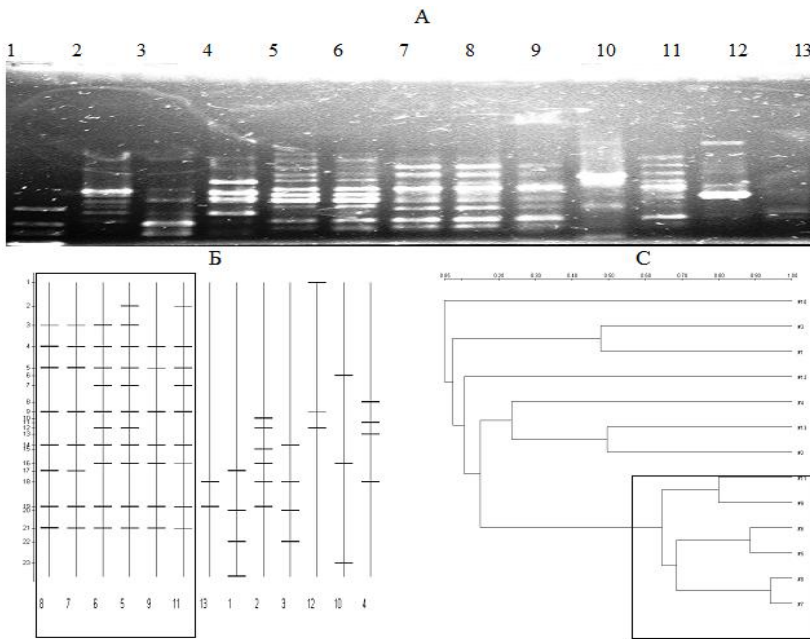


Рис. 3. Пример анализа продуктов амплификации с праймером M13 клинических изолятов *A. baumannii*: А – электрофореграмма; Б – диаграмма; С – дендрограмма филогенетического родства, построенная на основе метода невзвешенного попарного арифметического среднего UPGMA (Unweighted pair group method).

Влияние хлоргексидина и «Пронтосана®» на моновидовые и смешанные биопленки, образованные *S. aureus* и *P. aeruginosa*

Изменение биомассы биопленки и жизнеспособности клеток клинических штаммов *S. aureus* и *P. aeruginosa* при воздействии хлоргексидина и «Пронтосана®». Результаты исследования влияния антисептиков на биопленку, сформированную клиническими изолятами *S. aureus* (n=39) на гидрофобной поверхности в лунках полистиролового планшета, показали, что биомасса 24-часовой биопленки уменьшалась после воздействия «Пронтосана®» у 29 штаммов (72,5%), а хлоргексидина – только у 13 (32,5%) культур. Показатель, характеризующий величину/массивность биопленки, в контроле варьировал в пределах от $0,083 \pm 0,014$ до $0,410 \pm 0,068$ ед. ОП₅₈₀, медиана (квартили) составили 0,201 (0,112-0,296) ед. ОП₅₈₀, тогда как после воздействия «Пронтосана®» – 0,154 (0,095-0,287), а хлоргексидина – 0,165 (0,118-0,268) ед. ОП₅₈₀. Достоверность отличий в группах показана только для пары контроль/«Пронтосан®» (*t*-test: *p*=0,00013).

Установлено, что массивность биопленки *P. aeruginosa* (n=12) в контроле варьировала в пределах от $0,093 \pm 0,013$ до $0,430 \pm 0,011$ ед. ОП₅₈₀, Ме (Q1-Q3) составили 0,148 (0,128-0,213) ед. ОП₅₈₀. После воздействия хлоргексидина и «Пронтосана®» – 0,187 (0,166-0,205) и 0,071 (0,067-0,093) ед. ОП соответственно. Достоверность отличий в группах показана для пары контроль/«Пронтосан®» (*t*-test: *p*=0,00437) и хлоргексидин/«Пронтосан®» (*t*-test: *p*=0,00054).

Предполагая, что действие антисептических препаратов, применяемых в хирургической практике, будет существенно отличаться при моновидовой и смешанной инфекциях, представлялось важным изучить влияние антисептиков на моновидовые и полимикробные биопленки, сформированные данными бактериями. Биомасса биопленки, образованной клиническими изолятами *P. aeruginosa* (n=12) и штаммом *S. aureus* ATCC®29213, была достоверно больше, чем при росте штаммов синегнойной палочки в моновидовом варианте (*t*-test: *p*=0,00028). Величина показателя полимикробной биопленки варьировала в пределах от $0,186 \pm 0,067$ до $0,667 \pm 0,089$ ед. ОП₅₈₀, Ме (Q1-Q3) составили 0,365 (0,284-0,476) ед. ОП₅₈₀. После воздействия хлоргексидина в 10-и случаях зафиксирована

тенденция к снижению показателя массивности биопленки, тогда как при экспозиции с «Пронтосаном®» во всех вариантах (100%) установлено статистически значимое снижение биомассы. Достоверность отличий в группах выявлена для всех пар – контроль/«Пронтосан®» (t -test: $p=0,000001$), контроль/хлоргексидин (t -test: $p=0,02045$), хлоргексидин/«Пронтосан®» (t -test: $p=0,000002$).

Выживаемость бактерий под влиянием антибиотиков/антисептиков определяет эффективность терапии при инфекционных осложнениях. При оценке жизнеспособности клеток в моновидовых биопленках, образованных *P. aeruginosa*, обнаружено, что число КОЕ в контроле варьировало от $4,00E+05$ до $3,27E+07$, Ме (Q1-Q3) составили $3,32E+06$ ($7,33E+05$ - $7,00E+06$). Интересным представляется факт, что не было обнаружено корреляции между массивностью биопленки *P. aeruginosa* (ед. ОП₅₈₀) и количеством жизнеспособных клеток в ее составе (W -test: $p=0,26549$). После экспозиции биопленок с хлоргексидином количество жизнеспособных клеток статистически значимо снизилось до $3,12E+04$ ($4,00E+03$ - $4,77E+05$) (W -test: $p=0,01172$), а при воздействии «Пронтосана®» их не было выявлено ни в одном варианте. Данные, полученные для смешанной биопленки, были аналогичными (рис. 4): хлоргексидин достоверно снижал число жизнеспособных клеток во всех вариантах, медиана составила $1,40E+07$ для контроля и $1,77E+03$ для антисептика (W -test: $p=0,04312$), тогда как «Пронтосан®» полностью подавлял способность бактериальных клеток к росту.

КОЕ/мл

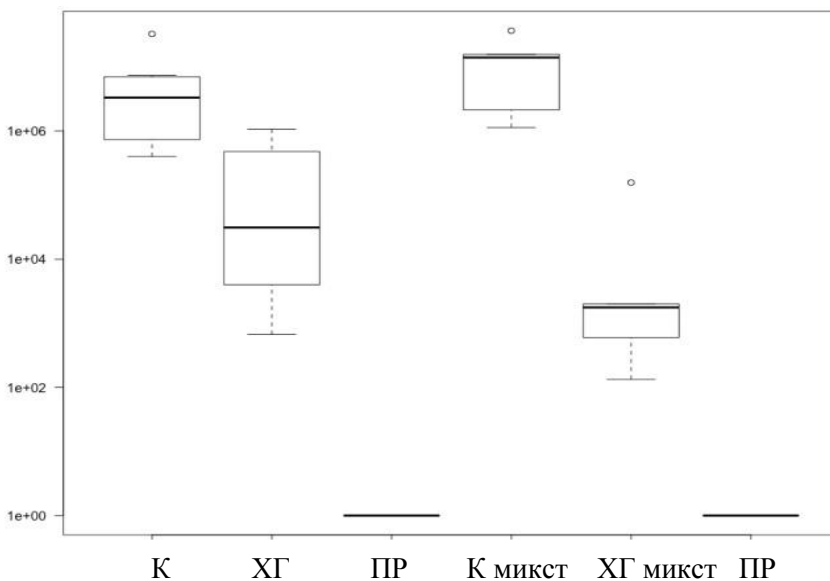


Рис. 4. Влияние хлоргексидина (ХГ) и «Пронтосана®» (ПР) на жизнеспособность клеток в моновидовой и смешанной биопленках, образованных клиническими изолятами *P. aeruginosa* и *S. aureus* ATCC®29213.

Таким образом, выявлено, что хлоргексидин, практически не влияя на биомассу псевдомонадных биопленок, оказывает разрушающее воздействие на биопленки, сформированные в смешанной культуре с референтным штаммом *S. aureus*. Влияние на стафилококковые биопленки было более выражено, чем на псевдомонадные, но и в этом случае уменьшение биомассы биопленки было только у трети клинических штаммов. Для некоторых культур как в моновидовом, так и в смешанном варианте показано, что экспозиция с хлоргексидином приводила к увеличению показателя массивности биопленки. Данный феномен может быть связан с тем, что под действием антисептика происходит лизис поверхностных клеток, содержимое которых (протеазы, лиазы, ДНК-азы) «разрыхляет» биопленку, что способствует проникновению красителя, обеспечивая ложное увеличение показателя биомассы биопленки при данном методе оценки. После экспозиции с «Пронтосаном®» показано уменьшение биомассы моновидовых биопленок для обеих

культур в 75% случаях и в 100% – для биопленок из ассоциации бактерий *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Сходные тенденции обнаружены при изучении в биопленках жизнеспособности клеток после воздействия биоцидов. «Пронтосан®» полностью снижал выживаемость бактерий как в моновидовых, так и полимикробных биопленках, тогда как при экспозиции с хлоргексидином клетки оставались жизнеспособными, хотя их число было достоверно меньше.

Морфометрические показатели, жизнеспособность клеток и массивность биопленок, образованных референтными штаммами *S. aureus* и *P. aeruginosa*, после воздействия антисептиков. По результатам исследования влияния антисептиков на биопленки, сформированные референтными штаммами *S. aureus* и *P. aeruginosa* на гидрофобной поверхности в лунках полистиролового планшета, показано, что после воздействия «Пронтосана®» биомасса моновидовых биопленок уменьшалась в 1,9 и 7,4 раза, соответственно, а смешанной биопленки – в 5,2 раза (табл. 3). Ни в одном из вариантов не выявлено снижения этого показателя после обработки хлоргексидином.

Таблица 3

Массивность и количество клеток в биопленках, образованных на поверхности полистирола смешанной и моновидовыми референтными культурами *S. aureus* и *P. aeruginosa*

Вариант	Биомасса биопленки, ОП ₅₈₀	Количество клеток, КОЕ/мл
<i>S.a</i>	0,232±0,049	9,25E+06 ± 1,12E+06
<i>S.a</i> +ХГ	0,213±0,045	2,60E+03 ± 0,78E+03*
<i>S.a</i> +ПП	0,123±0,068* ^α	0* ^α
<i>P.a</i>	0,547±0,066 ^β	2,13E+07 ± 0,53E+07 ^β
<i>P.a</i> +ХГ	0,475±0,126 ^β	2,67E+04 ± 0,36E+04* ^β
<i>P.a</i> +ПП	0,077±0,014* ^{α, β}	0* ^α
<i>S.a</i> + <i>P.a</i>	0,458±0,051 ^β	<i>S.a</i> 1,70E+06 ± 0,27E+06 <i>P.a</i> 1,45E+07 ± 0,45E+07 ^β
<i>S.a</i> + <i>P.a</i> +ХГ	0,518±0,081	<i>S.a</i> 2,00E+03 ± 1,76E+03 <i>P.a</i> 2,13E+04 ± 0,74E+04*
<i>S.a</i> + <i>P.a</i> +ПП	0,088±0,012* ^α	0* ^α

Примечание: * – различия статистически значимы при сравнении с контролем в соответствующем варианте (без обработки антисептиком), ^α – различия статистически значимы при сравнении с хлоргексидином (ХГ), ^β – различия статистически значимы при сравнении с *S. aureus* в аналогичных условиях (при p≤0,05); «Пронтосан®» (ПП).

При оценке жизнеспособности клеток в моновидовых биопленках обнаружено, что число КОЕ в контроле составило 9,25E+06 ± 1,12E+06 и 2,13E+07 ± 0,53E+07 для *S. aureus* и *P. aeruginosa*, соответственно. После экспозиции биопленок с хлоргексидином количество жизнеспособных клеток для обоих видов бактерий снизилось на три порядка, а при воздействии «Пронтосана®» их не было выявлено ни в одном варианте. Данные, полученные для смешанной культуры, позволили констатировать, что в составе биопленки присутствовали обе культуры бактерий и клетки их оставались жизнеспособными (росли на желточно-солевом и цетримидном агарах). Аналогично моновидовым вариантам, «Пронтосан®» полностью подавлял способность бактерий к росту на агаризованных селективных средах, тогда как при экспозиции с хлоргексидином в биопленках сохранялись жизнеспособные клетки обоих штаммов (табл. 3).

При анализе изображений, полученных с помощью АСМ, выявлено, что моновидовая биопленка, образованная на стекле референтным штаммом *S. aureus*, представлена скоплениями кокков и имеет структуру плотно прилегающих друг к другу клеток (табл. 4, рис. 5). Воздействие антисептиков изменяло размер клеток стафилококков, их диаметр становился достоверно меньше в обоих вариантах. После часовой обработки биопленок антисептиками появляются участки разряжения, более выраженные после контакта с «Пронтосаном®». Показатель Sq, характеризующий поверхность биопленки, образованной бактериями *S. aureus* на стекле, увеличивался в 1,4 и 3,5 раза после экспозиции с хлоргексидином и «Пронтосаном®» соответственно, что отразилось и на толщине биопленки, которая статистически значимо уменьшалась (табл. 4). При оценке жизнеспособности клеток с помощью КЛСМ (окраска LIVE/DEAD®) выявлено, что бактерии в контрольной биопленке в основном живые, но после контакта с антисептиками большинство их становилось поврежденными.

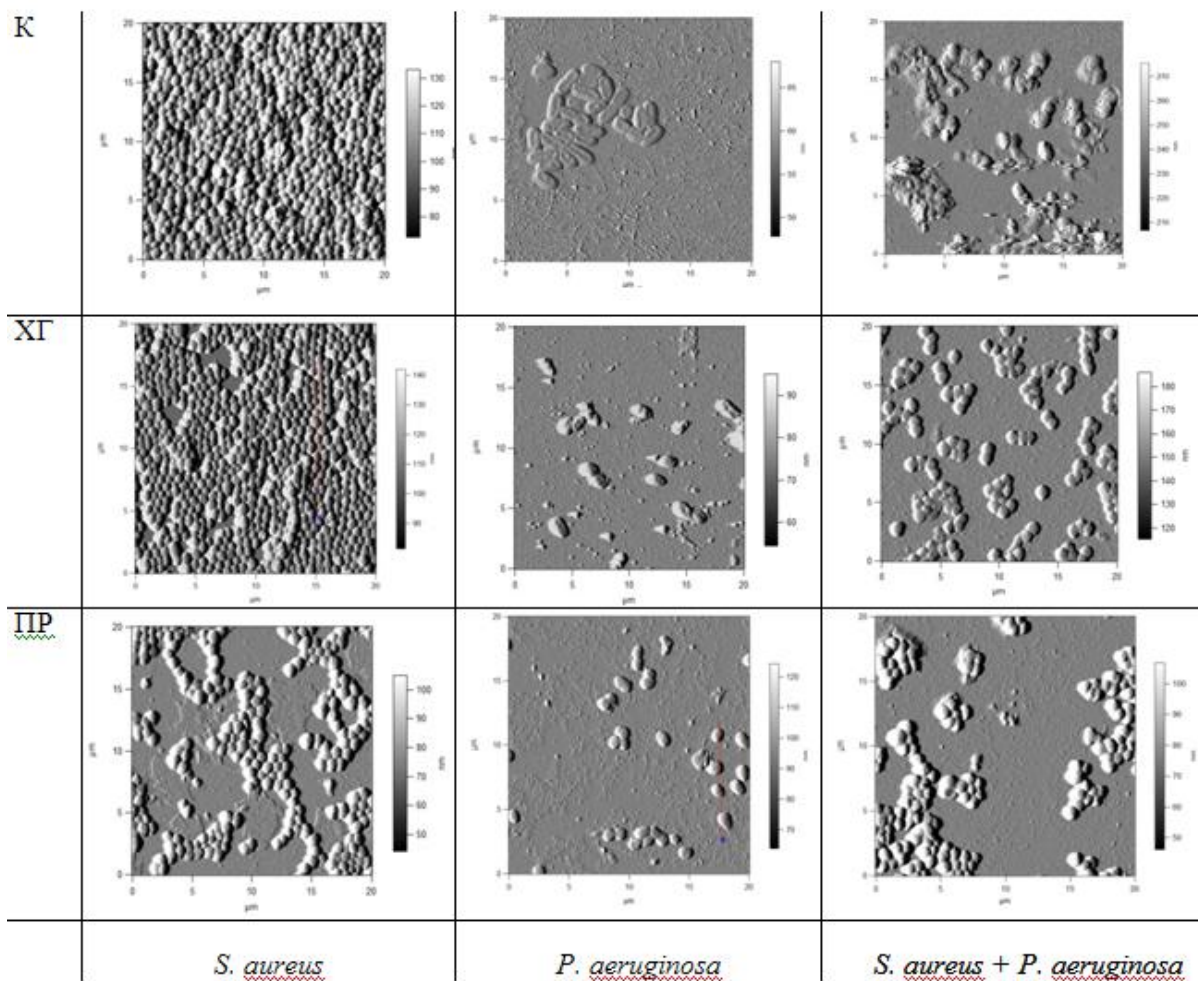


Рис. 5. АСМ и КЛСМ-изображения 20-часовой биопленки, образованной на стекле штаммами *S. aureus* и *P. aeruginosa* в моно- и микст варианте: К – контроль (ФБС), ХГ – хлоргексидин, ПР – «Пронтосан®».

Бактерии *P. aeruginosa* непрерывный монослой на стекле не формировали. На АСМ-изображении видны «многоклеточные островки», форма клеток четкая, округлая, определяются жгутики, и большинство клеток в биопленке жизнеспособные. После воздействия антисептиков морфологические параметры микробных клеток претерпевали существенные изменения: жгутики не визуализировались, клетки становились достоверно короче и толще – округлялись. Жизнеспособные клетки в биопленке практически не

встречались. Шероховатость клеточной поверхности псевдомонадной биопленки после контакта с хлоргексидином и «Пронтосаном[®]» увеличивалась в 1,2 и 1,5 раза соответственно (табл. 4). АСМ-изображение биопленки, сформированной при совместном росте двух штаммов бактерий, свидетельствует о том, что в ее состав входили обе культуры, но преобладающий вид – кокковая или палочковидная микробиота, оценить не представлялось возможным: палочковидные бактерии укорачивались и утолщались, кокки – увеличивались в диаметре. Структура биопленки разряженная, монослой не формировался. После часовой обработки смешанной биопленки растворами антисептиков сохранялись отдельные скопления бактерий на поверхности стекла. При количественном подсчете клеток после получения КЛСМ-изображений обнаружено снижение, как общего числа бактерий, так и жизнеспособных клеток. При этом их диаметр достоверно уменьшался в варианте с «Пронтосаном[®]», а типичные палочковидные клетки визуализировать не удалось. Показатель шероховатости поверхности полимикробной биопленки в большей степени увеличивался после контакта с «Пронтосаном[®]», что было выявлено и для моновидовых культур. Необходимо отметить, что и в бинарном, и в моновидовых вариантах при КЛСМ-сканировании толщина биопленки снижалась после обработки обоими антисептиками.

Таблица 4

Характеристики бактерий в биопленках, образованных на стекле смешанной и моновидовыми культурами *S. aureus* и *P. aeruginosa*

Вариант	Длина (мкм)	Ширина (мкм)	Диаметр (мкм)	Sq (нм)
<i>S.a</i>	-	-	1,10±0,08	105,2±32,4
<i>S.a</i> +ХГ	-	-	0,86±0,10*	150±26,5*
<i>S.a</i> +ПП	-	-	0,85±0,04*	370±37,0* ^a
<i>P.a</i>	2,81±0,22	0,90±0,05	-	138,3±44,3
<i>P.a</i> +ХГ	1,69±0,13*	0,98±0,12*	-	169,5±11*
<i>P.a</i> +ПП	1,37±0,17* ^a	0,94±0,01*	-	207,2±27,5* ^a
<i>S.a</i> + <i>P.a</i>	2,45±0,37	0,99±0,24	1,28±0,18	237,5±95,2
<i>S.a</i> + <i>P.a</i> +ХГ	н/о	н/о	1,14±0,15	336,5±38*
<i>S.a</i> + <i>P.a</i> +ПП	н/о	н/о	1,02±0,09	397,8±47,8* ^a

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем в соответствующем варианте (без обработки антисептиком), ^a – различия статистически значимы по сравнению с ХГ (p≤0,05).

Таким образом, применение АСМ и КЛСМ при изучении бактериальных биопленок референтных штаммов *S. aureus* и *P. aeruginosa* позволило оценить их фенотипические изменения под действием антисептических препаратов, а именно вариабельность морфологии клеток бактерий и структурных изменений клеточной поверхности. В результате воздействия биоцидов клетки становились меньше по размеру или округлялись, шероховатость поверхности увеличивалась. Дезорганизация поверхностных клеточных структур происходила под влиянием обоих антисептиков, но при воздействии «Пронтосана[®]» показатель шероховатости увеличивался более значимо. Сходные данные получены и при оценке жизнеспособности бактерий: использование «Пронтосана[®]» дало лучший антибактериальный эффект на сессильные клетки двух основных возбудителей раневых инфекций. В заключении следует отметить, что оба препарата активны в отношении

бактериальных биопленок, показано преимущество «Пронтосана®» для всех исследованных вариантов, которое, по-видимому, обусловлено действием амидопропил-бетаина, обладающего свойствами поверхностно-активного вещества, разрушающего биопленочную структуру, в результате чего бактерицидный компонент действует очень эффективно.

ВЫВОДЫ

1. Эффективность методов комбинированного хирургического лечения с использованием гидрохирургической системы и антисептика «Пронтосан®» по сравнению с традиционным лечением подтверждена следующими данными: уменьшением случаев лизиса аутодермотрансплантатов, уровня бактериальной обсемененности грануляционной ткани, снижением числа повторных операций и сокращением сроков стационарного лечения.
2. Гидрохирургическая обработка гранулирующих ожоговых ран с одномоментной аутодермопластикой являлась эффективным методом хирургического лечения ожогов III степени, когда грануляции не отвечали клиническим критериям готовности и имели уровень бактериальной обсемененности более 10^5 КОЕ/мл.
3. Показано, что использование в послеоперационном периоде повязок, пропитанных раствором «Пронтосана®», ингибировало рост раневой микробиоты, что приводило к снижению лизиса аутодермотрансплантатов с 20,2% до 6,5%.
4. Инфицирование ожоговой раны III степени более, чем в 40% случаев обусловлено *S. aureus* и *P. aeruginosa*, которые доминировали как при моновидовых, так и при смешанных инфекциях, первичном инфицировании или при смене возбудителя в ране, благодаря способности к длительному персистированию. Грамотрицательные неферментирующие бактерии в значительном проценте случаев были полирезистентными, при этом среди них не обнаружено носителей интегронов 1-го класса, *bla_{VIM-2}*.
5. Установлено, что под действием биоцидов происходили фенотипические изменения структурной организации бактериальных биопленок и морфологии сессильных клеток *S. aureus* и *P. aeruginosa*. Достоверное изменение линейных размеров клеток сопровождалось увеличением шероховатости их поверхности, более выраженное при воздействии «Пронтосана®», чем хлоргексидина.
6. При оценке жизнеспособности клеток выявлено, что «Пронтосан®» подавлял жизнеспособность бактерий в смешанной и моновидных биопленках, образованных как на гидрофильной, так и на гидрофобной абиотических поверхностях. В последнем случае уменьшалась и массивность биопленки во всех вариантах.
7. Использование алгоритма комбинированного хирургического лечения ожогов III степени, разработанного с учетом площади ожога, срока с момента термической травмы, клинических критериев готовности грануляций и бактериальной обсемененности раны, приводило к улучшению результатов лечения ожоговых ран.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Традиционное хирургическое лечение глубоких ожогов III степени показано при клинической готовности грануляций и бактериальной обсемененности менее 10^5 КОЕ/мл, если площадь ожога составляет до 10% п.т. и время от момента термической травмы менее 20 дней, или площадь ожога – от 11-20% п.т. при сроке от 20 до 30 дней.
2. При ожогах III степени до 10% п.т. гидрохирургическая обработка гранулирующих ран является операцией выбора, если с момента травмы прошло более 30 дней. Гидрохирургическое иссечение грануляционной ткани с последующим одномоментным

аутопластическим закрытием необходимо применять на 20-30 сутки в случае, когда ожоговые раны не отвечают критериям готовности к АДП.

3. Бактериальная обсемененность 10^5 КОЕ/мл является показанием к гидрохирургической обработке гранулирующих ран с последующей одномоментной аутодермопластикой и использованием в послеоперационном периоде «Пронтосана®».

4. Изучение антимикробного действия биоцидов следует проводить в моновидовых и смешанных биопленках с определением массивности биопленки и жизнеспособности бактериальных клеток, что обеспечивает объективность оценки эффективности препарата.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список работ, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки РФ

1. Самарцев, В.А. Результаты комплексного лечения глубоких ожогов / В.А. Самарцев, Т.И. Карпунина, М.В. Кузнецова, **Ю.А. Еньчева**, Н.М. Дронов, В.М. Грихуттик // Перм. мед. журн. – 2013. – Т.30. – №1. – С. 15–19.
2. Самарцев, В.А. Использование гидрохирургической системы versajet для подготовки ожоговых ран к свободной аутодермопластике / В.А. Самарцев, **Ю.А. Еньчева**, Н.М. Дронов, В.М. Грихуттик // Перм. мед. журн. – 2013. – Т.30. – №4. – С. 7–11.
3. Самарцев, В.А. Особенности инфицирования ожоговых ран / В.А. Самарцев, Т.И. Карпунина, М.В. Кузнецова, **Ю.А. Еньчева** // Новости хирургии. – 2014. – Т.22. – №2. – С. 199–206.
4. **Еньчева, Ю.А.** Влияние хлоргексидина и «Пронтосана» на биопленку, сформированную *Staphylococcus aureus* (исследование *in vitro*) / **Ю.А. Еньчева**, М.В. Кузнецова, Е.А. Рубцова, Е.В. Афанасьевская, В.А. Самарцев // Перм. мед. журн. – 2015. – Т.32. – №1. – С. 84–91.
5. **Еньчева, Ю.А.** Оценка эффективности подготовки ожоговых ран к аутодермопластике с использованием гидрохирургической системы versajet и повязок fibrotul ag silkofix / **Ю.А. Еньчева**, В.А. Самарцев // Хирургическая практика. – 2015. – №4. – С. 23–27.
6. Кузнецова, М.В. Влияние хлоргексидина и Пронтосана на смешанную и моновидовые биопленки, образованные *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* / М.В. Кузнецова, **Ю.А. Еньчева**, В.А. Самарцев // Антибиотики и химиотерапия. – 2015. – Т.60. – №11-12. – С. 15–21.

Работы, опубликованные в других изданиях

7. Самарцев, В.А. Использование гидрохирургической системы versajet для подготовки ожоговых и длительно существующих ран к свободной аутодермопластике / В.А. Самарцев, **Ю.А. Еньчева** // Материалы Международной научно-практической конференции «Хирургическая обработка ран и гнойно-некротических очагов у детей и взрослых». – Москва, 2014. – С. 206-207.
8. Самарцев, В.А. Сравнительная оценка эффективности подготовки ожоговых ран к аутодермопластике с использованием гидрохирургической системы versajet / В.А. Самарцев, **Ю.А. Еньчева** // Материалы II Международного конгресса, посвященного 70-ти летию института им. А.В. Вишневого «Раны и раневые инфекции». – Москва, 2014. – С. 316-317.
9. Самарцев, В.А. Особенности инфицирования ожоговых ран / В.А. Самарцев, **Ю.А. Еньчева**, М.В. Кузнецова, Т.И. Карпунина // Материалы II Международного конгресса,

посвященного 70-ти-летию института им. А.В. Вишневского «Раны и раневые инфекции». – Москва, 2014. – С. 317-318.

10. **Еньчева, Ю.А.** Влияние антисептиков на биопленку, сформированную бактериями *Staphylococcus aureus* / **Ю.А. Еньчева**, М.В. Кузнецова, Е.А. Рубцова, Е.В. Афанасьевская., В.А. Самарцев // Материалы научно-практической конференции по медицинской микологии (XVIII Кашкинские чтения). С.-Петербург. – Проблемы медицинской микологии. – 2015. – Т. 17, №2. – С. 69.

11. **Еньчева, Ю.А.** Сравнительная оценка эффективности подготовки ожоговых ран к аутодермопластике с использованием гидрохирургической системы versajet / **Ю.А. Еньчева**, В.А. Самарцев // Материалы XII Съезда хирургов России. – Ростов-на-Дону, 2015. – С. 891-892.

12. **Еньчева, Ю.А.** Действие антисептиков на биопленки клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* в монокультурах и в ассоциации / **Ю.А. Еньчева**, М.В. Кузнецова, А.А. Колоколова // Материалы XII Съезда хирургов России. – Ростов-на-Дону, 2015. – С. 893-894.

13. **Еньчева, Ю.А.** Действие антисептиков на биопленки клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в монокультуре и в ассоциации с *Staphylococcus aureus* / **Ю.А. Еньчева**, А.А. Колоколова, М.В. Кузнецова // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9(18). – №2(1). – С. 637–639.

14. **Еньчева, Ю.А.** Использование гидрохирургической системы для подготовки ожоговых ран к свободной аутодермопластике у пациентов старшей возрастной группы / **Ю.А. Еньчева**, В.А. Самарцев, Н.М. Дронов // Материалы I Съезда хирургов Приволжского федерального округа. – 2016. – С. 52–53.

15. **Еньчева, Ю.А.** Особенности подготовки глубоких ожогов к свободной аутодермопластике у пациентов старшей возрастной группы / **Ю.А. Еньчева**, В.А. Самарцев, Н.М. Дронов // Материалы I съезда хирургов Приволжского федерального округа. – 2016. – С. 53–54.

16. **Еньчева, Ю.А.** Сравнительная оценка эффективности подготовки ожоговых ран к аутодермопластике с использованием гидрохирургической системы и раствора на основе полигексанида / **Ю.А. Еньчева**, В.А. Самарцев, Н.М. Дронов // Материалы I съезда хирургов Приволжского федерального округа. – 2016. – С. 54–55.

Заявки на патенты РФ

Кузнецова М.В., Самарцев В.А., **Еньчева Ю.А.** Способ оценки антибактериального действия антисептиков на микробные биоплёнки (приоритетная справка №2016122539 от 07.06.2016).

Рационализаторские предложения

1. Самарцев В.А., **Еньчева Ю.А.**, Кузнецова М.В. Использование повязок с ионами серебра для лечения ожогов ШБ-IV степени (удостоверение на рационализаторское предложение №2696 от 19.04.2016).

2. Самарцев В.А., **Еньчева Ю.А.**, Кузнецова М.В. Использование гидрохирургической системы для обработки гранулирующих ран при обширных ожогах ШБ-IV степени (удостоверение на рационализаторское предложение №2697 от 19.04.2016).

3. Самарцев В.А., **Еньчева Ю.А.**, Кузнецова М.В. Алгоритм лечения ожогов ШБ-IV степени (удостоверение на рационализаторское предложение №2709 от 29.10.2016).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДП	–	Аутодермопластика
АСМ	–	Атомно-силовая микроскопия
ГХОГР	–	Гидрохирургическая обработка гранулирующих ран
КЛСМ	–	Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия
КОЕ	–	Колониеобразующая единица
ПР	–	«Пронтосан [®] »
ТХЛ	–	Традиционное хирургическое лечение
ФБС	–	Фосфатно-буферная среда
ХГ	–	Хлоргексидин