

С.Д. Федянин

канд. мед. наук, доцент кафедры госпитальной хирургии
Учреждения образования «Витебский государственный
ордена Дружбы народов медицинский университет»

S.D. Fedzianin

Vitebsk State Order of Peoples Friendship Medical
University, candidate of medical sciences, assistant professor
of the Department of Hospital Surgery

ОБОСНОВАНИЕ МЕСТНОГО ЛЕЧЕНИЯ ГНОЙНЫХ РАН ФАРМАКОЦИТАМИ С ДИОКСИДИНОМ

THE SUBSTANTIATION OF LOCAL TREATMENT OF PURULENT WOUNDS BY PHARMACOCYTES WITH DIOXYDIN

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Федянин Сергей Дмитриевич, канд. мед. наук, доцент
кафедры госпитальной хирургии Учреждения
образования «Витебский государственный орден
Дружбы народов медицинский университет»
Адрес: 210 023, Республика Беларусь, Витебск,
пр. Фрунзе, д. 27
Тел.: +375295118909; e-mail: fedyanin-1977@mail.ru
Статья поступила: 30.06.2017
Статья принята: 29.09.2017

CONTACT INFORMATION

Siarhei Fedzianin, Vitebsk State Order of Peoples Friendship
Medical University, candidate of medical sciences, assistant
professor of the Department of Hospital Surgery
Address: 210 023, Republic of Belarus, Vitebsk, Frunze Ave., 27
Tel.: +375295118909; e-mail: fedyanin-1977@mail.ru
Article submitted: 30.06.2017
Article approved: 29.09.2017

Аннотация

В статье представлены результаты обоснования местного лечения гнойных ран фармакоцитами с диоксидином. На 77 штаммах, изолированных из раневого отделяемого пациентов с гнойными ранами различных локализаций, изучены минимальные подавляющие концентрации (МПК), МПК₅₀ и МПК₉₀ диоксида. Исследование степени включения диоксида в эритроцитарные фармакоциты проведено на 25 пробах крови пациентов-добровольцев. Изучение концентрации диоксида и диоксида, включенного в эритроцитарные фармакоциты, в гнойных ранах в 1 фазу раневого процесса выполнено у 35 пациентов-добровольцев.

В работе использованы стандартные бактериологические методы. Диоксидин включали в тени методом гипосмотического гемолиза. Концентрация диоксида в фармакоцитах определялась методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на жидкостном хроматографе Agilent 1260. Для разрушения эритроцитарных теней к ним добавляли дистиллированную воду и обрабатывали в течение 10 мин в ультразвуковой ванне «Сапфир». Микроскопическое исследование проводили методом световой иммерсионной микроскопии в нативном мазке на автоматизированном комплексе Leica.

МПК₉₀ всех штаммов ведущих возбудителей инфекций в хирургии составила 106,25 мкг/мл. Установлено, что эритроцитарные тени являются контейнерами для диоксида. Средняя концентрация диоксида

Abstract

The article discusses the topical purulent wounds treatment with pharmacocytes and dioxidin. MIC, MIC₅₀ and MIC₉₀ of dioxidin were tested on 77 strains, isolated from the purulent wounds of various localizations. The study of the degree of dioxidin inclusion in erythrocyte pharmacocytes involved 25 blood samples of volunteer patients. The study of the concentration of dioxidin and dioxidin, included in erythrocyte pharmacocytes, in purulent wounds in the 1 phase of wound process was performed in 35 volunteer patients.

Standard bacteriological methods were used in the work. Dioxidin included in the ghosts by hypotonic hemolysis. The concentration of dioxidin in the erythrocyte ghosts determined by high performance liquid chromatography on Agilent 1260 liquid chromatograph. For the destruction of erythrocyte ghosts thereto distilled water was added and treated for 10 minutes in an ultrasonic bath of «Sapphire». Microscopic examination of erythrocyte ghosts was performed by light microscopy immersion in the native smear on the automated complex Leica.

MIC₉₀ of all strains of the leading pathogens of infections in surgery was 106,25 µg/ml. It was found that the erythrocyte ghosts are containers for dioxidin. The average concentration of dioxidin in them is 2151.72 ± 17.53 µg/ml, which is 6,9 times higher than the MIC₉₀ to the majority of representatives of the microflora of purulent wounds. The pharmacocytes with dioxidin create a prolonged bactericidal concentration of dioxidin in purulent wounds

в них составляет $2151,72 \pm 17,53$ мкг/мл, что в 6,9 раза выше МПК₉₀ для большинства представителей микрофлоры гнойных ран. Фармакоциты, насыщенные диоксидином, создают пролонгированную бактерицидную концентрацию диоксидина в гнойных ранах в течение 24 ч с момента нанесения препарата. Через сутки в ране определяется $704,76 \pm 4,093$ мкг ($71,76 \pm 1,26$ %) введенного препарата.

Ключевые слова: эритроцитарные фармакоциты, диоксидин, гнойные раны.

within 24 hours from the time of application. In a day in the wound 704.76 ± 4.093 μg (71.76 ± 1.26 %) of the injected drug is determined.

Keywords: erythrocyte pharmacocytes, dioxydin, purulent wounds.

Направленный транспорт лекарственных средств — это целенаправленная доставка препаратов в патологический очаг. По эффективности и минимальной токсичности он может быть сравнен с «точечным бомбовым ударом». Целенаправленная доставка лекарственных средств в патологический очаг позволяет создать в нем высокую концентрацию вводимого препарата, максимально снизить нежелательные реакции организма на медикаментозное воздействие, а также терапевтическую дозу медикамента и кратность введения. Он может быть основан на регионарном введении препаратов, на использовании различных носителей, обладающих тропностью к определенным органам и тканям. В качестве носителей в настоящее время применяются микроконтейнеры: аутологичные клетки крови, капсулы из альбумина, липосомы, магнитные микросферы, микрокапсулы из нейлона [1, 2, 3].

Методы, основанные на использовании аутологичных клеток крови для направленного транспорта, можно объединить под общим названием «экстракорпоральная фармакотерапия» [4]. Клетки крови (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты), используемые для направленного транспорта, получили название «фармакоциты» [5].

Впервые введение химических соединений (аденозинтрифосфорная кислота) в тени эритроцитов (эритроцитарные фармакоциты) было осуществлено Gardos G. в 1953 году [6]. В 1973 году Ihler G.M. et. al. было опубликовано сообщение об успешном включении в эритроцитарные носители ферментов для непосредственной доставки к органам-мишеням [7].

Возможность использования эритроцитарных фармакоцитов как контейнеров для лекарственных препаратов в клинической хирургии изучается достаточно давно. Так, Жумадилов Ж.Ш. и Макаренкова Р.В. исследовали включение антибиотиков в эритроцитарные тени при гипоосмотическом гемолизе. По их данным, наибольшим включением характеризуются антибиотики группы аминогликозидов (канамицин, гентамицин) [8]. В дальнейшем авторы обосновали применение направленного

транспорта канамицина в тени эритроцитов в печень при гнойно-воспалительных заболеваниях желчных путей и выявили его большую эффективность по сравнению с традиционным внутривенным способом введения [9].

Нуртазинова Г.С. предложила оригинальный способ лечения гнойно-некротических заболеваний мягких тканей. Пациенту производится вскрытие гнойного очага, иссечение некротических тканей, обработка раны антисептиками. Затем края и дно раны обрабатываются эритроцитарными фармакоцитами, содержащими разовую дозу антибиотика. На рану накладываются первичные швы. В послеоперационном периоде края раны обрабатываются эритроцитарными тенями дважды с интервалом 6–8 ч после первого введения. Клинико-цитологические исследования установили, что местное применение эритроцитарных фармакоцитов и наложение первичного шва при гнойно-некротических заболеваниях мягких тканей купируют гнойно-воспалительный процесс, быстрее нормализуют клинико-лабораторные показатели, значительно сокращают сроки течения фаз раневого процесса. Применение эритроцитарных фармакоцитов в сочетании с первичным швом гнойной раны позволяет также сократить расход антибиотиков и иммуномодуляторов, дает хороший функциональный и косметический эффекты [10].

Абишева Г.Н. применила аутологичные эритроцитарные тени, насыщенные антибактериальными препаратами, для обработки ран при остром деструктивном мастите с последующим наложением первичных швов. Доказана высокая эффективность данного метода, который сократил сроки заживления ран в 2,5 раза [11].

Берикханова К.Е. сообщает об использовании аналогичного подхода в лечении острого и хронического парапроктита. Автору удалось сократить сроки лечения пациентов в 2,7 раза, снизить частоту рецидивов гнойно-воспалительного процесса в 4,7 раза [12].

Одним из наиболее эффективных антибактериальных препаратов в настоящее время является

диоксидин [13]. Однако повязки, смоченные диоксидином, в течение нескольких часов высыхают. В связи с этим является весьма актуальным изучение возможности использования диоксидина, включенного в аутологичные эритроцитарные носители, для местного лечения гнойных ран.

Цели исследования: 1. Изучить МПК, МПК₅₀ и МПК₉₀ диоксидина для ведущих возбудителей хирургических инфекций. 2. Изучить степень включения диоксидина в аутологичные эритроцитарные тени. 3. Изучить концентрацию диоксидина и диоксидина, включенного в эритроцитарные фармакоциты, в гнойных ранах в 1-ю фазу раневого процесса.

МЕТОДЫ

Исследования проведены на 77 штаммах, изолированных из раневого отделяемого пациентов, находившихся на лечении с гнойными ранами различных локализаций в Республиканском научно-практическом центре «Инфекция в хирургии» и отделении проктологии Государственного учреждения здравоохранения «Витебская городская центральная клиническая больница» (ГУЗ «ВГЦКБ») в 2014–2015 гг.

В работе использованы стандартные бактериологические методы.

Идентификация микроорганизмов проводилась с помощью тест-систем на биохимическом анализаторе АТВ Expression фирмы «bioMerieux» (Франция). Для идентификации использовались стрипы: ID 32 STARH — для стафилококков, ID 32 E — для энтеробактерий, ID 32 GN — для грамотрицательных палочек.

Для определения МПК диоксидина использовали метод серийного разведения в жидкой питательной среде (бульоне).

Определение МПК₅₀ и МПК₉₀ выполняли по разработанному нами методу [14]. После определения МПК диоксидина у ряда изучаемых штаммов микроорганизмов выполняли построение графической модели путем отложения по оси абсцисс полученных значений МПК диоксидина, кратных двум, а по оси ординат — числа штаммов, чувствительных к данной концентрации препарата, после чего построенные точки соединяли линией. МПК₅₀ находили путем проведения горизонтальной линии от точки на оси ординат, соответствующей 50 % штаммов, чувствительных к антимикробному препарату, до пересечения с кривой, от места которого опускали перпендикуляр к оси абсцисс до величины значения МПК. Аналогично определяли МПК₉₀ для антимикробного препарата.

Исследование степени включения диоксидина в эритроцитарные фармакоциты проведено на 25 пробах крови пациентов-добровольцев, находящихся на стационарном лечении в отделении

проктологии ГУЗ «ВГЦКБ» в 2015 г. с гнойными ранами различных локализаций.

Включение в эритроцитарные тени диоксидина производили по методике [4] в нашей модификации.

Исследование концентрации диоксидина и диоксидина, включенного в эритроцитарные фармакоциты, в гнойных ранах в 1-ю фазу раневого процесса выполнено у 35 пациентов-добровольцев, находящихся на стационарном лечении в отделении проктологии ГУЗ «ВГЦКБ» в 2016 г. с гнойными ранами различных локализаций.

Исследование одобрено комиссией по врачебной этике и деонтологии ГУЗ «ВГЦКБ» и соответствует этическим стандартам Комитета по экспериментам на человеке Хельсинкской декларации 1975 г. и ее пересмотренного варианта 2000 г.

Высокоэффективная жидкостная хроматография производилась на жидкостном хроматографе Agilent 1260 (США). Условия хроматографирования: колонка длиной 0,15 м и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная октадецилсилильным силикагелем для хроматографии Р с размером частиц 5 мкм (Agilent Eclipse XDB-C18 5 mkm 4.6x150 mm); подвижная фаза: смешивают в соотношении 82:18 (об/об) буфер рН 6,8 — метанол Р2. Приготовление буфера с рН 6,8: 0,3 мл триэтиламина Р растворяют в 800 мл воды для хроматографии Р, доводят рН до 6,8 фосфорной кислотой Р. Полученный раствор переносят в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл и доводят объем раствора до 1000 мл водой для хроматографии Р. Скорость потока 1,1 мл/мин. Температура колонки 20°C. Объем ввода пробы 20 мкл. Спектрофотометрический детектор, длина волны 260 нм. Время анализа — 2 времени удерживания диоксидина (время выхода диоксидина около 3 мин).

Для разрушения эритроцитарных теней к ним добавляли дистиллированную воду и обрабатывали в течение 10 мин в ультразвуковой ванне «Сапфир» (Россия).

Микроскопическое исследование эритроцитарных теней проводили методом световой иммерсионной микроскопии в нативном мазке на автоматизированном комплексе, состоящем из светового микроскопа Leica DM 2000 (Германия), камеры DFC 295 (Twain Version 7.7.1.0; ExLib 5.1.0.10442; Firmwave 1.0.11) и программного обеспечения Leica Application Suite Version 4.4.0 (Build: 454).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделено 27 (35,06 %) микроорганизмов рода *Staphylococcus*, 25 штаммов (32,47 %) семейства *Enterobacteriaceae*, 25 штаммов (32,47 %) неферментирующих грамотрицательных палочек (НГОП).

Стафилококки были представлены *S. aureus* — 23 штамма (29,87 %) и *S. epidermidis* — 4 (5,19 %). Эн-

Таблица 1

МПК диоксидина для ведущих возбудителей хирургических инфекций (мкг/мл)

Микроорганизмы	МПК (min-max)	МПК ₅₀	МПК ₉₀
Стафилококки (n = 27)	31,25–125	83,33	120,75
Энтеробактерии (n = 25)	31,25–125	37,5	78,125
НГОП (n = 25)	62,5–125	57,5	112,5
Все изоляты (n = 77)	31,25–125	58,34	106,25

МПК — минимальная подавляющая концентрация; НГОП — неферментирующие грамотрицательные палочки.

теробактерии были идентифицированы как *E. coli* — 7 (9,09 %), *K. pneumoniae* — 4 (5,19 %), *K. oxytoca* — 4 (5,19 %), *P. mirabilis* — 4 штамма (5,19 %), *P. vulgaris* — 3 (3,9 %), *E. cloacae* — 3 (3,9 %). Из представителей НГОП выделены: *P. aeruginosa* — 20 изолятов (25,97 %), *Acinetobacter baumannii* — 3 штамма (3,9 %), *Stenotrophomonas maltophilia* — 2 штамма (2,6 %).

МПК диоксидина для ведущих возбудителей хирургических инфекций представлена в табл. 1.

При изучении степени насыщения эритроцитарных теней диоксидином установлено, что концентрация диоксидина в эритроцитарных фармакоцитах варьирует от 1999,72 мкг/мл до 2232,45 мкг/мл и в среднем составляет 2151,72 ± 17,53 мкг/мл.

По нашим данным, МПК₉₀ диоксидина для большинства возбудителей хирургических инфекций составляет 106,25 мкг/мл. Таким образом, полученная концентрация диоксидина в 20,25 раза превышает МПК₉₀.

В смывах из гнойных ран через 2 ч после нанесения диоксидина препарат определяется в минимальных концентрациях, меньших величины МПК₉₀ в 14,9 раза. Его содержание варьирует от 1,63 до 7,14 мкг и в среднем составляет 4,48 ± 0,28 мкг. Остаточная доля антимикробного препарата варьирует от 0,003 % до 0,014 % и в среднем составляет 0,009 ± 0,003 %.

В смывах из гнойных ран через 24 ч после нанесения эритроцитарных фармакоцитов с диоксидином содержание диоксидина варьирует от 697,55 до 708,2 мкг, в среднем составляет 704,76 ± 4,093 мкг и превышает МПК₉₀ в 6,63 раза. Остаточная доля препарата варьирует от 69,99 до 73,42 % и в среднем составляет 71,76 ± 1,26 %.

На рис. 1 представлена микроскопическая картина ненасыщенных эритроцитарных теней.

Как видно из рисунка, ненасыщенные эритроцитарные носители характеризуются полиморфизмом. Они могут быть внешне схожи с дрепаноцитами (серповидными клетками) — похожи на серп; эллиптоцитами (овалоцитами) — овальная или удлиненная форма; сфероцитами — шаровидная форма.

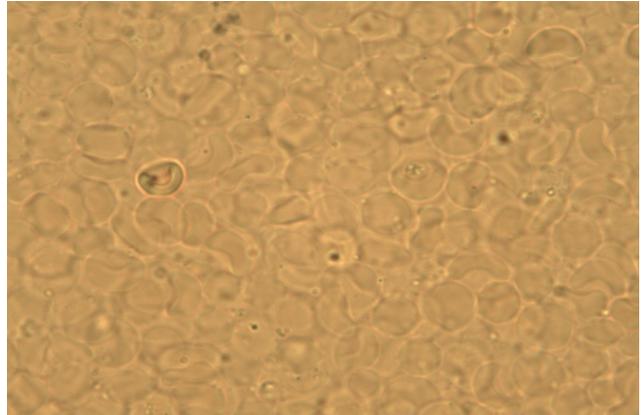


РИС. 1. Микроскопическая картина ненасыщенных эритроцитарных теней (×1000)

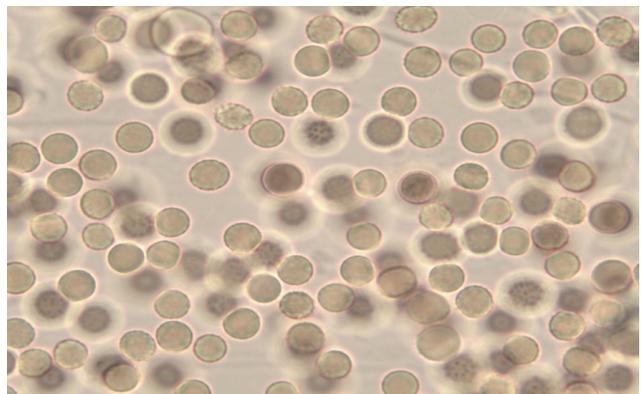


РИС. 2. Микроскопическая картина насыщенных диоксидином эритроцитарных теней (×1000)

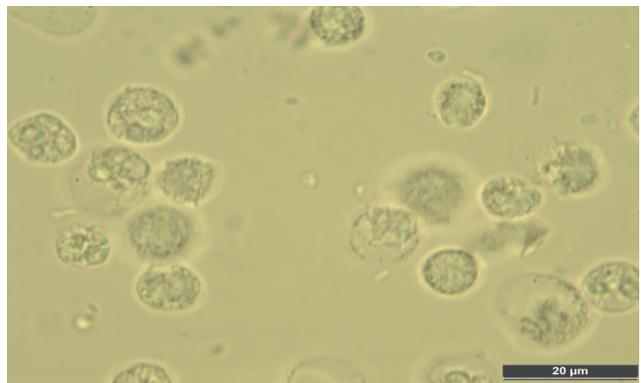


РИС. 3. Микроскопическая картина насыщенных диоксидином эритроцитарных теней в смыве из раны через 24 ч (×1000)

На рис. 2 представлена микроскопическая картина насыщенных диоксидином эритроцитарных теней.

Насыщенные диоксидином эритроцитарные тени характеризуются мономорфизмом. Они внешне схожи со сфероцитами. Внутри видны микровезикулы.

На рис. 3 представлена микроскопическая картина насыщенных диоксицином эритроцитарных теней в смыве из раны через 24 ч.

Эритроцитарные фармакоциты в смыве характеризуются полиморфизмом. Целостность мембраны сохранена. Определяются тени, наполовину и полностью заполненные микровезикулами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. На современном этапе диоксицин сохраняет высокую активность в отношении ведущих возбудителей хирургических инфекций в нашем регионе. МПК₉₀ диоксицина для большинства возбудителей хирургических инфекций составляет 106,25 мкг/мл.
2. Аутологичные эритроцитарные тени являются контейнерами для диоксицина. Средняя концентрация препарата в них составляет $2151,72 \pm 17,53$ мкг/мл, что в 20,25 раза выше МПК₉₀ для большинства представителей микрофлоры гнойных ран.
3. Эритроцитарные фармакоциты, насыщенные диоксицином, создают пролонгированную бактерицидную концентрацию диоксицина в гнойных ранах в течение 24 ч с момента нанесения препарата. Через сутки в ране определяется $704,76 \pm 4,093$ мкг ($71,76 \pm 1,26$ %) введенного препарата.
4. Представляется весьма целесообразным использовать диоксицин, включенный в эритроцитарные фармакоциты, для местного лечения гнойных ран в 1-ю фазу раневого процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Генинг Т.П., Колкер И.И., Жумадилов Ж.Ш. Использование форменных элементов крови для направленной доставки химиотерапевтических и диагностических препаратов в очаг поражения // Антибиотики и химиотерапия. 1988; 11: 867–871.
[Gening T.P., Kolker I.I., Zhumadilov Zh.Sh. Use of blood elements for directional delivery of chemotherapeutic and diagnostic drugs to the lesion site // Antibiotics and chemotherapy. 1988; 11: 867–871.] (In Russian)
2. Ивонин А.Г., Пименов Е.В., Оборин В.А. [и др.] Направленный транспорт лекарственных препаратов: современное состояние вопроса и перспективы // Известия Коми НЦ УрО РАН. 2012; 1(9): 46–55.
[Ivonin A.G., Pimenov E.V., Oborin V.A. [et al.] Directed transport of medicines: the current state of the issue and prospects // Izvestiya Komi NTS UB RAS. 2012; 1 (9): 46–55.] (In Russian)
3. Экстракорпоральная фармакотерапия: реалии и перспективы [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://anesth.medi.ru/gorb01.htm>. Дата доступа: 4.07.2015.
[Extracorporeal pharmacotherapy: realities and prospects [Electronic resource]. Access mode: <http://anesth.medi.ru/gorb01.htm>. Date of access: 4.07.2015.] (In Russian)

4. Костюченко А.Л. Эфферентная терапия. СПб.: Фолиант. 2000. 432 с.
[Kostyuchenko A.L. Efferent therapy. St. Petersburg: Foliant. 2000. 432 p.] (In Russian)
5. Мовшев Б.Е., Витвицкий В.М., Лисовская И.Л. Трансфузионные среды: перспективы // Новое в трансфузиологии. 2001; 28: 39–40.
[Movshev B.E., Vitvitsky V.M., Lisovskaya I.L. Transfusion environments: perspectives // New in transfusiology. 2001; 28: 39–40.] (In Russian)
6. Gardos G. Akkumulatión de kalium onch durch menschliche Blufkorperchen // Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 1953; 6: 191–196.
7. Ihler G.M., Glew R.M., Schnure F.W. Enzyme loading of erythrocytes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1973; 70(9): 2663–2666.
8. Жумадилов Ж.Ш., Макаренкова Р.В. Особенности включения некоторых антибиотиков в эритроцитарные тени — систему целенаправленной доставки химиотерапевтических препаратов // Антибиотики и химиотерапия. 1990; 11: 54–56.
[Zhumadilov Zh.Sh., Makarenkova R.V. Features of the inclusion of some antibiotics in erythrocyte shadow — a system of targeted delivery of chemotherapeutic drugs // Antibiotics and chemotherapy. 1990; 11: 54–56.] (In Russian)
9. Жумадилов Ж.Ш., Макаренкова Р.В. Фармакокинетика канамицина при направленном транспорте в печень в тенях эритроцитов у животных с экспериментальным острым холециститом // Антибиотики и химиотерапия. 1990; 11: 37–38.
[Zhumadilov Zh.Sh., Makarenkova R.V. Pharmacokinetics of kanamycin with directed transport to the liver in the shadows of erythrocytes in animals with experimental acute cholecystitis // Antibiotics and chemotherapy. 1990; 11: 37–38.] (In Russian)
10. Нуртазинова Г.С. Роль эритроцитарных фармакоцитов в комплексном лечении абсцессов мягких тканей: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Астана, 1995. 25 с.
[Nurtazinova G.S. The role of erythrocyte pharmacocytes in the complex treatment of soft tissue abscesses: author's abstract. Dis.... cand. med. sci. Astana. 1995. 25 p.] (In Russian)
11. Абишева Г.Н. Первичный шов в хирургии абсцедирующего мастита: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Астана, 2001. 24 с.
[Abisheva G.N. Primary suture in the surgery of abscessing mastitis: author's abstract. Dis.... cand. med. sci. Astana. 2001. 24 p.] (In Russian)
12. Берикханова К.Е. Первичный шов в хирургии острого и хронического парапроктита: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Семей, 2005. 26 с.
[Berikhanova K.E. Primary suture in the surgery of acute and chronic paraproctitis: author's abstract. Dis.... cand. med. sci. Semey. 2005. 26 p.] (In Russian)
13. Чекмарева И.А., Блатун Л.А., Крутиков М.Г. [и др.] Диоксицин: морфологические аспекты эффективности // Местное и медикаментозное лечение ран и гнойно-некротических очагов у детей и взрослых: материалы международного науч.-практ. конф. Сочи. 2015. 247–249.
[Chekmareva I.A., Blatun L.A., Krutikov M.G. [et al.] Dioxycine: morphological aspects of efficacy // Local and drug treatment of wounds and purulent-necrotic foci in children and adults: Materials of Intern. scientific-practical. conf. Sochi. 2015. 247–249.] (In Russian)
14. Удостоверение на рационализаторское предложение «Определение МИК₅₀ и МИК₉₀ антибактериальных препаратов с помощью графической модели», № 60, выданное УО «ВГМУ» 11.09.08.
[Certificate on the rationalization proposal “Determination of MIC₅₀ and MIC₉₀ of antibacterial drugs using a graphic model», No. 60, issued by the VSMU 11.09.08.] (In Russian)