

Новая возможность применения бактериофагов для профилактики инфекционных осложнений при свободной кожной пластике (бактериофаги при кожной пластике)

Бесчастнов В.В.¹, Рябков М.Г.¹, Юданова Т.Н.², Павленко И.В.¹, Леонтьев А.Е.¹, Тулупов А.А.¹, Кичин В.В.¹

¹ Городская клиническая больница (ГКБ) № 30
Россия, 603157, г. Нижний Новгород, ул. Березовская, 85а

² ООО «Новые перевязочные материалы»
Россия, 141351, Московская область, Сергиево-Посадский район, дер. Жучки, 2и

РЕЗЮМЕ

Цель. Профилактика инфекционного процесса в области реципиентной раны при свободной кожной пластике расщепленным трансплантатом.

Материалы и методы. Разработан способ иммобилизации бактериофагов в области аутодермотрансплантата путем перевода раствора, содержащего бактериофаги, в гелевую форму. Выполнены микробиологические и клинические исследования эффективности предложенного способа.

Результаты. Подтверждена жизнеспособность бактериофагов в гелевой повязке в сроки до 4 сут и снижение вероятности развития местных инфекционных осложнений при кожной пластике.

Заключение. Гелевая композиция, содержащая бактериофаги, позволяет оперативно реагировать на изменения актуальной госпитальной микрофлоры и эффективно противодействовать опасности нозокомиального инфицирования.

Ключевые слова: бактериофаги, свободная кожная пластика, расщепленный трансплантат, раневые осложнения, микрофлора.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Приволжским исследовательским медицинским университетом (протокол № 1 от 27.02.2018).

Для цитирования: Бесчастнов В.В., Рябков М.Г., Юданова Т.Н., Павленко И.В., Леонтьев А.Е., Тулупов А.А., Кичин В.В. Новая возможность применения бактериофагов для профилактики инфекционных осложнений при свободной кожной пластике (бактериофаги при кожной пластике). *Бюллетень сибирской медицины*. 2021; 20 (1): 16–22. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2021-1-16-22>.

✉ Павленко Илья Викторович, e-mail: ilyapavlenko@bk.ru.

New possibility of application of bacteriophages to prevent infectious complications in free skin grafting (bacteriophages in skin grafting)

Beschastnov V.V.¹, Ryabkov M.G.¹, Yudanova T.N.², Pavlenko I.V.¹, Leont'ev A.E.¹, Tulupov A.A., Kichin V.V.¹

¹ City Clinical Hospital No. 30
85a, Berezovskaya Str., Nizhny Novgorod, 603157, Russian Federation

² LLC "Novye Perevyazochnye Materialy"
2i, vil. Zhuchki, Sergiyevo-Posadsky District, Moscow Oblast, 141351, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To prevent infectious processes in the area of a recipient wound in free skin grafting with a split-graft.

Materials and methods. A method was developed for immobilizing bacteriophages in the area of split thickness skin grafts through transferring a solution containing bacteriophages into a gel form. Microbiological and clinical studies of the effectiveness of the proposed method were performed.

Results. The viability of bacteriophages in a gel dressing for up to 4 days was confirmed, as well as the reduced likelihood of local infectious complications in skin grafting.

Conclusion. The gel composition containing bacteriophages allows quick response to changes in current hospital microflora and effectively counteract the dangers of nosocomial infection.

Key words: bacteriophages, free skin grafting, split thickness skin grafts, wound complications, microflora.

Conflict of interest. Authors declare no actual or potential conflict of interest related to publication of this manuscript.

Source of financing. The authors state that there is no funding for the study.

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the local Ethics Committee Privolzhsky Research Medical University (Protocol No. 1 of 27.02.2018).

For citation: Beschastnov V.V., Ryabkov M.G., Yudanova T.N., Pavlenko I.V., Leont'ev A.E., Tulupov A.A., Kichin V.V. New possibility of application of bacteriophages to prevent infectious complications in free skin grafting (bacteriophages in skin grafting). *Bulletin of Siberian Medicine*. 2021; 20 (1): 16–22. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2021-1-16-22>.

ВВЕДЕНИЕ

Количество больных, которые нуждаются в кожно-пластических операциях для закрытия дефектов мягких тканей, неуклонно растет. Актуальность проблемы закрытия дефектов мягких тканей объясняется как увеличением частоты военных, бытовых и техногенных травм, так и растущим уровнем техники в области сосудистой хирургии, обеспечивающим сохранение конечности при облитерирующих заболеваниях сосудов, в том числе при наличии трофических язв мягких тканей [1].

Пластика кожного дефекта расщепленным аутодермотрансплантатом является одной из самых распространенных операций в силу своей относительной безопасности и технической простоты. Однако одним из лимитирующих факторов является высокая чувствительность трансплантата к развитию ин-

фекции. Это объясняется большой распространенностью госпитальной флоры, обладающей высокой вирулентностью и антибиотикорезистентностью, а также особенностями техники выполнения данных операций. Аутодермотрансплантат на реципиентной ране фиксируют многослойной повязкой на период до 4–7 сут. Под повязкой за счет отсутствия света, наличия питательных веществ, жидкости, благоприятного температурного режима создаются идеальные условия для роста и деления микроорганизмов, попавших под нее. Аутодермотрансплантат же, первые 4–5 сут питаясь лишь за счет диффузии кислорода и нутриентов из сосудов реципиентной раны и не обладая собственной сосудистой сетью, практически беззащитен перед микроорганизмами [2].

Цель исследования – профилактика инфекционного процесса в области реципиентной раны при

свободной кожной пластике расщепленным трансплантатом, что является одним из принципиальных условий неосложненного течения раннего послеоперационного периода.

Для достижения поставленной цели необходимо решить две задачи: выбрать агент, способный преодолеть антибиотикорезистентность госпитальной флоры, и добиться сохранения его концентрации под повязкой, принимая во внимание необходимость минимального механического и химического воздействия на трансплантат. В настоящее время для преодоления феномена антибиотикорезистентности активно исследуется возможность использования бактериофагов [3].

Основной принцип лечения инфекционных процессов при помощи бактериофагов сформулирован первооткрывателем этого рода вирусов Ф. Д'Эреллем: «...вводить бактериофаг в организм нужно таким образом, чтобы реализовать возможно быстрый и возможно более интимный контакт его с бактериями, подлежащими разрушению» [4]. Для создания и поддержания высокой концентрации бактериофагов вокруг трансплантата нами использовались современные перевязочные материалы, разработанные отечественной компанией ООО «Новые перевязочные материалы» (г. Москва).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для защиты аутодермотрансплантата от госпитального инфицирования разработан способ местного применения бактериофагов [5]. Предварительно методом ретроспективного анализа выявляли актуальную госпитальную микрофлору, являющуюся причиной местных раневых осложнений при кожной пластике. Из имеющихся в продаже коммерческих препаратов бактериофагов подготавливали набор, к которому чувствительны выявленные госпитальные патогены, затем – повязку на реципиентную рану, содержащую выбранные бактериофаги. Для иммобилизации бактериофагов раствор, в котором они находились, переводили в состояние геля, который затем накладывали на трансплантат.

Заготовка для повязки представляет собой пленку из поливинилового спирта – гидрофильного биосовместимого полимера, который является подходящей матрицей для иммобилизации биоактивных веществ [6]. Полимерная пленка имеет в своем составе фосфатный буфер для создания кислотно-щелочной среды (рН 6,6 ÷ 7,8), оптимальной для бактериофагов. Толщина пленки составляет 40 мкм, но при добавлении раствора с бактериофагами пленка впитывает его, набухает в течение 30–60 с и преобразуется в гель с образованием гелевой пластины.

Способ осуществляли следующим образом. Выполняли аутодермопластику расщепленным трансплантатом. После фиксации аутодермотрансплантата на реципиентной ране *интраоперационно готовили повязку*. Для этого на пленку из поливинилового спирта добавляли 0,05–0,2 мл/см² раствора бактериофагов, к которым чувствительны выявленные госпитальные патогены, в результате чего пленка и раствор переходили в гелевую форму в виде пластины. После этого укрывали трансплантат и реципиентную рану полученной гелевой пластиной.

Для контроля жизнеспособности и эффективности бактериофагов, иммобилизованных в гелевой повязке, выполнили бактериологические исследования *in vitro* и *in vivo*. При исследовании *in vitro* получали предложенным способом гелевую пластину, содержащую бактериофаги. Жизнеспособность и биологическую доступность (высвобождение) бактериофагов из гелевой повязки определяли на газонах культуры тест-штамма *Staphylococcus aureus*.

На чашку Петри, с газоном культуры тест-штамма *Staphylococcus aureus*, в качестве контроля наносили каплю раствора, содержащего бактериофаги (контроль 1), образец раневого покрытия, полученного нанесением на пленку физиологического раствора (контроль 2), и опытный образец раневого покрытия площадью 1 см², полученный путем нанесения на пленку раствора бактериофага. Затем инкубировали при температуре 37 °С, оценку результатов проводили визуально через 24 ч по наличию или отсутствию зон лизиса. Для определения длительности периода жизнеспособности бактериофагов в геле, его образцы площадью 1 см² наносили на газоны тестовых культур через 48, 72 и 96 ч после формирования гелевой пластины.

В клинике предложенный способ использовали после выполнения свободной кожной пластики расщепленным трансплантатом у 25 пациентов с хроническими ранами мягких тканей. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие. Исследование выполнено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации.

Критерием включения пациентов в исследование было состояние реципиентной раневой поверхности, оцениваемое в 16–17 баллов по шкале готовности раны к свободной аутодермопластике [7]. Контрольную группу составили 108 пациентов с хроническими ранами мягких тканей, которым была выполнена аутодермопластика за период 2014–2017 гг. Жизнеспособность и биологическую доступность (высвобождение) бактериофагов из гелевой повязки

в условиях *in vivo* определяли у четырех пациентов основной группы. У этих пациентов в качестве активного антибактериального агента использовали бактериофаги, к которым имелись чувствительные тест-штаммы *Staphylococcus aureus*. На первой перевязке гель, покрывающий трансплантат, собирали стерильным шпателем и наносили на чашку Петри с газоном культуры тест-штамма *Staphylococcus aureus*. Критерием эффективности профилактики инфекционных процессов в области трансплантата считали снижение частоты местных гнойно-воспалительных осложнений.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с применением программы Statistica 10.0. Для оценки статистической значимости различий при сравнении качественных эффектов в парах распределений применяли точный метод Фишера. Критическое значение уровня значимости принималось равным 5% ($p \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При ретроспективном анализе данных микробиологических исследований в контрольной группе из 108 пациентов выявлено, что при выполнении свободной аутодермопластики местные гнойно-воспалительные осложнения отмечены в 24 случаях (22%). Эти осложнения представлены лизисом и гнойным расплавлением трансплантата и оказались ассоциированы с присутствием в ране *Streptococcus pyogenes* (5 случаев) и неферментирующих грамотрицательных бактерий – *Pseudomonas aeruginosa* (6 случаев), *Acinetobacter* spp. (4 случая). По данным производителя (ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России), способностью лизировать штаммы *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* обладает коммерческий официальный препарат «Пиобактериофаг поливалентный», который и был выбран как антиинфекционный агент для защиты аутодермотрансплантата. В основной группе отмечен 1 (4%) случай гнойного расплавления части аутодермотрансплантата ($p = 0,045$).

При анализе результатов бактериологических исследований *in vitro* зафиксировано появление на месте капли фага (контроль 1) «негативной колонии», т.е. зоны лизиса (полного подавления видимого роста микроорганизма) (рис. 1). Такая же зона лизиса отмечена в геле, содержащем фаг. В области геля, содержащего физиологический раствор, зон лизиса не обнаружено. Литические свойства бактериофагов сохранялись через 48, 72 и 96 ч после формирования гелевой пластины из раствора бактериофага (рис. 2).

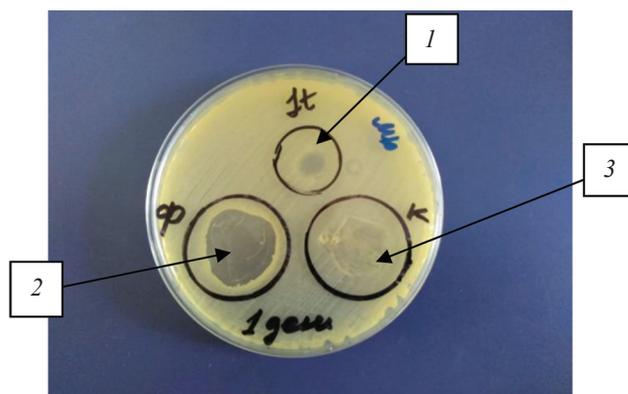


Рис. 1. Чашка Петри с негативными колониями (зонами лизиса) на газонах культуры тест-штамма *Staphylococcus aureus*: 1 – в местах нанесения раствора, содержащего бактериофаг (контроль); 2 – в местах нанесения геля, полученного из раствора бактериофага (экспозиция геля – 24 ч), *in vitro*; 3 – отсутствие зон лизиса в области нанесения геля, полученного из стерильного физиологического раствора



Рис. 2. Чашка Петри с негативными колониями (зонами лизиса) на газонах культуры тест-штамма *Staphylococcus aureus*: 1 – в местах нанесения раствора, содержащего бактериофаг (контроль); 2 – в местах нанесения геля, полученного из раствора бактериофага (экспозиция геля – 96 ч), *in vitro*

Приводим клинический пример использования предложенного способа.

Большая К., 1962 г. р., поступила в отделение гнойной хирургии ГБУЗ НО «ГКБ № 30 Московского района» 16.01.2019 с диагнозом «Сахарный диабет 2-го типа декомпенсированный (целевой уровень гликированного гемоглобина менее 7,5%). Диабетическая полинейропатия, сенсомоторная форма. Синдром диабетической стопы, нейроишемическая форма, Wagner II, состояние после ампутации IV–V пальцев левой стопы от 12.06.2018. Ишемическая болезнь сердца: атеросклеротический кардиосклероз. Хроническая сердечная недостаточность IIА (II функциональный класс). Артериальная гипертензия: II стадия, 2-й степени. Риск 3. Дислипидемия. Ожирение 2-й степени».

На латеральной поверхности левой стопы сформировалась рана 3×4 см и глубиной около 0,4 см. По данным микробиологического исследования раневого экссудата, выявлено наличие в нем ассоциации *Pseudomonas aeruginosa* и *Proteus mirabilis* 10^7 КОЕ/мл. После перехода раневого процесса во II фазу и элиминации микроорганизмов из раны принято решение выполнить закрытие хронической раны латеральной поверхности левой стопы свободным расщепленным кожным трансплантатом. Подготовлен раствор бактериофагов («Пиобактериофаг поливалентный»), к которым, по данным бактериологического анализа, чувствительны выявленные госпитальные патогены. Бактериофаги находились в жидкой среде во флаконах емкостью 20 мл.

19.01.2019 выполнена свободная аутодермопластика расщепленным лоскутом толщиной 0,3 мм, который был взят с переднелатеральной поверхности левого бедра. После фиксации аутодермотрансплантата интраоперационно подготовили повязку на реципиентную рану. Для этого на пленку размером 10×10 см из поливинилового спирта, содержащую фосфатный буфер с pH (6,6–7,8) в количестве $(1 \div 3) \times 10^{-5}$ моль/г, нанесли 10 мл раствора «Пиобактериофага поливалентного», в результате чего образовалась гелевая пластина. Затем укрыли трансплантат и реципиентную рану полученной гелевой пластиной (рис. 3). На гелевую пластину наложили асептическую повязку, которую сняли через 4 сут (рис. 4).

При визуальном осмотре аутодермотрансплантат жизнеспособен, фиксирован к реципиентной ране, покрыт тонким слоем геля. Признаков инфекционного процесса нет. Гель собрали стерильным шпателем, нанесли на чашку Петри с тестовой культурой. Через сутки экспозиции выявлены прозрачные зоны



Рис. 3. На аутодермотрансплантат нанесен гель, содержащий бактериофаг

лизиса тестовой культуры в области нанесения геля (рис. 5), что свидетельствует о наличии в геле бактериофага, обладающего литической активностью ++++ (4 плюса).



Рис. 4. Аутодермотрансплантат на 4-е сут после свободной кожной пластики, жизнеспособен, покрыт слоем геля

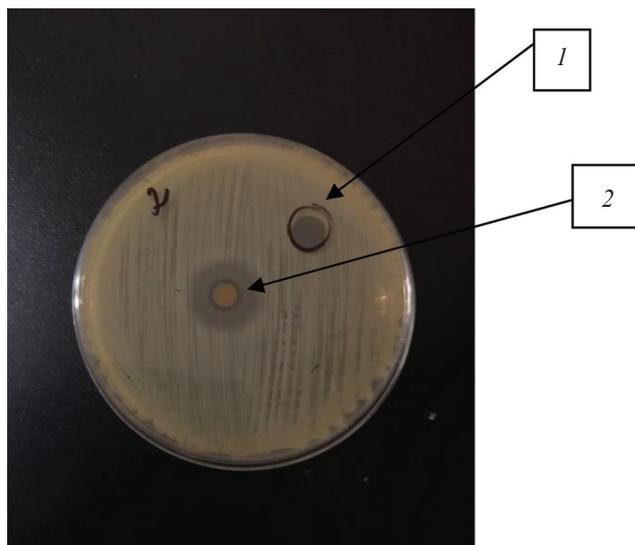


Рис. 5. Чашка Петри с негативными колониями (зонами лизиса) на газонах культуры тест-штамма *Staphylococcus aureus* в местах нанесения: 1 – свежего раствора, содержащего бактериофаг (контроль); 2 – геля, полученного из раствора бактериофага и находившегося на ране в виде повязки в течение 4 сут

ОБСУЖДЕНИЕ

На современном этапе можно выделить основные свойства бактериофагов, определяющие целесообразность их применения при профилактике и лечении хирургической инфекции [3]:

- отсутствие влияния на физиологическую микрофлору;

- стимуляция факторов специфического и неспецифического иммунитета;
- возможность применения у пациентов с аллергическими реакциями к антибиотикам;
- полная совместимость с любыми лекарственными средствами;
- отсутствие токсических и тератогенных эффектов.

Традиционный способ местного применения бактериофагов заключается в поддержании влажной среды вокруг раневой поверхности путем орошения раны и повязки раствором, содержащем бактериофаги [4]. Поскольку при высыхании марлевой повязки активность бактериофагов резко падает, необходимы повторное периодическое обильное смачивание повязки раствором бактериофага и частые перевязки, что ведет к нецелевому расходованию ресурсов и не обеспечивает покой трансплантату.

С целью упрощения технологии применения и удлинения срока активности бактериофагов на раневой поверхности зарубежными и отечественными исследователями ведутся активные поиски технологий, позволяющих осуществлять их иммобилизацию в структуре полимерных носителей. На основе современных технологий [8] предлагается способ ковалентной иммобилизации бактериофага на наноструктурированном носителе в виде нетканого нановолокнистого материала из поликапролактона. При этом бактериофаги располагаются в заданном положении: капсид прочно связан с носителем, а хвост остается свободным, что позволяет им активно воздействовать на бактерии. В работе [9] с целью промышленного получения раневых покрытий с бактериофагами исследовано влияние типа полимерной матрицы на активность бактериофагов, иммобилизованных в структуре покрытий, путем введения в раствор полимера и последующего высушивания разными способами.

Наилучшие результаты получены авторами при иммобилизации стафилококкового и синегнойного фагов в структуре полимерной биodeградируемой повязки из полиэфирамида с использованием лиофильной сушки [9]. Однако принципиальным недостатком, присущим всем способам промышленной иммобилизации бактериофагов на повязке, является то, что хирургу в операционной невозможно выполнить подбор бактериофага к актуальному именно в данной медицинской организации патогену, с учетом чувствительности конкретного штамма микроорганизма.

Кроме того, необходимо решить технически сложную задачу сохранения жизнеспособности бактериофагов в период создания, транспортировки и

хранения повязки. В работе [10] предлагается наносить раствор, содержащий бактериофаги, на коллагеновую гемостатическую губку и в дальнейшем укрывать ею трансплантат. Однако известно, что коллагеновая губка содержит борную и уксусную кислоты, а в кислой среде бактериофаги инактивируются, так как их максимальная активность проявляется при рН от 6,6 до 7,8 [4].

Таким образом, к настоящему моменту поиски эффективного и недорогого способа противодействия опасности нозокомиального инфицирования не привели к успеху. Современные микробиологические лаборатории обеспечивают хирурга точной информацией об актуальной госпитальной микрофлоре и ее чувствительности к антибактериальным препаратам, а также обладают методами определения чувствительности микрофлоры к бактериофагам и подбора эффективного бактериофага к условиям конкретной медицинской организации. Возможность профилактического использования в этих условиях бактериофагов для предотвращения инфекционного процесса, вызванного госпитальными микроорганизмами, становится реальной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, решена задача иммобилизации бактериофагов с сохранением их функции в области кожной пластики на период до 4–5 сут. Создаваемая extempore гелевая композиция, содержащая бактериофаги, позволяет оперативно реагировать на изменения актуальной госпитальной микрофлоры и эффективно противодействовать опасности нозокомиального инфицирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кудыкин М.Н., Дерябин Р.А., Васягин А.Н., Рябков М.Г., Шейко Г.Е., Маклахов И.В. Выживаемость при выполнении первичных и вторичных ампутаций у больных с критической ишемией нижних конечностей. *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2017; 23 (2): 126–129.
2. Грибань П.А., Мартыненко Е.Е., Лемешко Т.Н. Анализ морфологических изменений в аутодермотрансплантате после кожной пластики. *Фундаментальные исследования*. 2010; 11: 37–41.
3. Додова Е.Г., Горбунова Е.А., Аполихина И.А. Постантибиотиковая эра: бактериофаги как лечебная стратегия. *Медицинский вестник*. 2015; 1: 49–53.
4. Покровская М.П., Каганова Л.С., Морозенко М.А., Булгакова А.Г., Скаценко Е.Е. Лечение ран бактериофагами. М.: Гос. изд-во мед. лит., 1941; 51.
5. Патент РФ № 2018139554, 07.05.2019. Способ профилактики инфекционных процессов при свободной кожной пластике. Патент России № 2687108. 2018. Бюл. № 13. Бесчастнов В.В., Юданова Т.Н., Рябков М.Г., Леонтьев А.Е., Павленко И.В., Кичин В.В.

-
6. Юданова Т.Н., Алешина Е.Ю., Гальбрайт Л.С., Крестьянова И.Н. Фармакокинетические свойства пленок с комбинированным биологическим действием. *Химико-фармацевтический журнал*. 2003; 37 (11): 26–28.
 7. Юрова Ю.В., Шлык И.В. Современные возможные способы определения готовности гранулирующих ран к свободной аутодермопластике у пациентов с термической травмой. *Вестник хирургии им. И.И. Грекова*. 2013; 172 (1): 60–64.
 8. Nogueira F., Karumidze N., Kusradze I., Goderdzishvili M., Teixeira P., Gouveia I.C. Immobilization of bacteriophage in wound-dressing nanostructure. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2017; 13 (8): 2475–2484. DOI: 10.1016/j.nano.2017.08.008.
 9. Ковязина Н.А., Лукин П.С., Функнер Е.В. Подходы к конструированию полимерных раневых покрытий с бактериофагами. *Медицинский альманах*. 2013; 2 (26): 72–74.
 10. Орлов А.Г., Липин А.Н. Коллагеновые губчатые повязки в сочетании с бактериофагами в комплексном лечении синдрома диабетической стопы. Пилотное наблюдение. В кн.: Хирургические инфекции кожи и мягких тканей у детей и взрослых: материалы междунар. науч.-практ. конф. Симферополь, 2017; 184–187.
-

Вклад авторов

Бесчастнов В.В. – разработка концепции и дизайна, обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания. Рябков М.Г., Павленко И.В., Леонтьев А.Е., Тулупов А.А., Кичин В.В. – анализ и интерпретация данных. Юданова Т.Н. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

Сведения об авторах

Бесчастнов Владимир Викторович, д-р мед. наук, профессор-консультант, хирургическое отделение, ГКБ № 30, г. Нижний Новгород. ORCID 0000-0002-9332-3858.

Рябков Максим Георгиевич, д-р мед. наук, профессор-консультант, хирургическое отделение, ГКБ № 30, г. Нижний Новгород. ORCID 0000-0002-9555-190X.

Юданова Татьяна Николаевна, д-р хим. наук, зав. лабораторией ООО «Новые перевязочные материалы», Московская обл., Сергиево-Посадский район, дер. Жучки. ORCID 0000-0003-0509-5988.

Павленко Илья Викторович, ординатор, хирургическое отделение, ГКБ № 30, г. Нижний Новгород. ORCID 0000-0003-0509-5988.

Леонтьев Андрей Евгеньевич, канд. мед. наук, профессор-консультант, хирургическое отделение, ГКБ № 30, г. Нижний Новгород. ORCID 0000-0002-9332-3858.

Тулупов Александр Александрович, ординатор, хирургическое отделение, хирургическое отделение, ГКБ № 30, г. Нижний Новгород. ORCID 0000-0003-0509-5988.

Кичин Владимир Владимирович, ординатор, хирургическое отделение, ГКБ № 30, г. Нижний Новгород. ORCID 0000-0002-7271-2758.

(✉) **Павленко Илья Викторович**, e-mail: ilyapavlenko@bk.ru

Поступила в редакцию 18.12.2019

Подписана в печать 30.04.2020