

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ НА ЭТАПАХ МЕДИЦИНСКОЙ ЭВАКУАЦИИ

Венгерович Н.Г.¹, Хрипунов А.К.², Рузанова Э.А.³, Никифоров А.С.¹,
Иванов И.М.¹, Ткаченко А.А.⁴.

¹Научно-исследовательский испытательный институт (военной медицины) Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, 195043, г. Санкт-Петербург,
ул. Лесопарковая д. 4;

²Институт высокомолекулярных соединений РАН, г. Санкт-Петербург;

³ООО «Инновационная фармацевтическая компания «Сильвер-Фарм»;

⁴Санкт-Петербургский государственный университет.

+7 (911) 1252560, nickolai@vengerovich.ru

Резюме. Экспериментально изучена эффективность применения гель-пленки целлюлозы *Gluconacetobacter xylinus* на моделях тяжелой термической травмы и ранения живота с эвентрацией внутренних органов. Показано, что местное применение раневых покрытий на основе исследуемых гель-пленок, содержащих раствор антисептического препарата оптимизирует раневой процесс в большей степени в I первой фазе, а также обеспечивает заживление ран самостоятельно (без кожной пластики), что невозможно обеспечить средствами стандартной терапии. При ранениях живота с эвентрацией внутренних органов применение гель-пленок бактериальной целлюлозы в качестве повязки первой медицинской помощи предотвращает развитие посттравматической спаечной болезни брюшины. Показана возможность применения изделий на основе бактериальной целлюлозы на всех уровнях системы лечебно-эвакуационных мероприятий.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, *Gluconacetobacter xylinus*, раневой процесс, термический ожог, раневое покрытие, повязка первой медицинской помощи, индивидуальный перевязочный пакет, ранение живота, эвентрация

RESEARCH ON POSSIBILITY OF APPLICATION OF BACTERIAL CELLULOSE DURING MEDICAL EVACUATION OPERATIONS

Vengerovich N.G., Khripunov A.K., Ruzanova E.A., Nikiforov A.S., Ivanov I.M.,
Tkachenko A.A.

1Research Testing Institute (military medicine) Military Medical Academy named after SM
Kirov

2 Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg;
3ООО "Innovative pharmaceutical company" Silver-Farm ";

4Sankt Petersburg State University.

Abstract. We've conducted an experimental study of Gluconacetobacter xylinus cellulose gel film application effectiveness using major thermal injury model and abdominal trauma with eventration of the abdominal viscera model. We show that local application of wound dressings based on gel film in question with an antiseptic agent could optimise wound process [mostly/significantly] on the first phase while also assuring wound self-healing (without need for skin grafting), which is not possible by the means of standard therapy. Bacterial cellulose gel film application as an first aid dressing during abdominal trauma with eventration of the abdominal viscera prevents posttraumatic peritoneal adhesion. We also show possibility of application of bacterial cellulose products on any stage of medical evacuation operations.

Key words: bacterial cellulose, Gluconacetobacter xylinus, wound process, thermal injury, wound dressing, first aid dressing, abdominal trauma, eventration.

Введение. В последнее время отмечается изменение структуры боевой хирургической травмы, что обусловлено современным характером военных действий и совершенствованием применяемого вооружения – прослеживается ярко выраженная тенденция к утяжелению травмы. Это требует формирования новых способов оказания медицинской помощи, включая разработку высокоэффективных методов лечения, медицинской реабилитации и внедрения инновационных технологий на всех этапах эвакуации и лечения больных, как в мирное, так и в военное время [5].

По данным литературы в мире отмечается чрезвычайно высокий интерес к целлюлозе, продуцируемой эволюционно различными видами организмов [7, 9]. Так, например, биосинтез и свойства бактериальной целлюлозы широко исследуются за рубежом и в России применительно к разным областям человеческой

деятельности, особенно в медицине [1, 6, 10]. При поверхностном культивировании *Gluconacetobacter xylinus* сборка макромолекул бактериальной целлюлозы (БЦ) заканчивается на наноуровне, что ведёт к образованию уникальной по иерархии строения гидроколлоидной плёнки. Это позволяет вводить в нее разнообразные системы с сохранением высокой механической прочности на разрыв [8]. Исследование свойств бактериальной целлюлозы в медицине ведется по множеству направлений: раневые покрытия, лечение ожогов, имплантация, дефекты хрящей и др [11].

Ранее, под руководством профессора В.А. Попова были изучены физико-химические свойства БЦ и показано, что местное применение покрытий на ее основе оптимизирует раневой процесс [4]. Тем не менее, не было проведено сравнения с существующими аналогами и традиционными средствами лечения ран, а также, не установлено, в какие фазы раневого процесса предпочтительно их применение. Учитывая свойства материала, можно предположить, что применение БЦ должно быть эффективным в качестве повязки первой медицинской помощи при проникающих ранениях живота, сопровождающихся эвентрацией. Считаем, что дополнительные исследования должны конкретизировать показания к применению изделий на основе гель-пленок БЦ на этапах медицинской эвакуации.

Цель исследования: в условиях эксперимента изучить эффективность применения бактериальной целлюлозы на различных экспериментальных моделях для конкретизации места её применения в системе лечебно-эвакуационных мероприятий.

Материалы и методы.

Для получения БЦ использовали синтезирующий целлюлозу штамм уксуснокислых бактерий, выделенный в 1992 г. и первоначально идентифицированный фенотипически как *Gluconacetobacter xylinus*. Культивирование бактерий производили в поверхностных условиях при $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в среде, содержащей (г/л): глюкоза – 20; дрожжевой экстракт – 0,5; этанол – 2,0 (о.б.). В качестве инокулята использовали семисуточную культуру штамма. Гель-пленку необходимой толщины отмывали от остатков культуральной жидкости дистиллированной водой и многократным кипячением в 0,5 % растворе NaOH для удаления белка клеток, после чего тщательно отмывали дистиллированной водой до нейтральной реакции, получая таким образом химически чистую целлюлозу.

Исследование гель-пленок БЦ в качестве покрытия для лечения ран проводили на модели гранулирующих ран после глубоких ожогов III Б степени. Для воспроизведения модели тяжелой термической травмы у животных (50 беспородных крыс-самцов, массой 200–240 г.) выстригали шерсть в зоне нанесения ожога. В качестве обжигающей поверхности использовали медную пластину размером $2,0 \times 2,0$ см с температурой нагрева

180°С. Ожог наносили контактным способом под эфирным наркозом в течение 12 с. Через двое суток выполняли некрэктомию ожогового струпа, с последующей аппликацией исследуемых материалов и фиксацией их тканевым лейкопластырем. перевязки проводили ежедневно. Критериями эффективности служили: скорость заживления, сроки полного заживления и макроскопическая картина ран на 5, 7, 10, 14, 17, 21, 23 и 28-е сутки. Было сформировано 5 групп по 10 животных в каждой: контрольная группа (без лечения); группа препарата сравнения – раневое покрытие HydroSorb Hartmann (гидроколлоидная повязка, наиболее близкая по своей структуре из имеющихся на рынке к гель-пленкам БЦ); группа стандартной терапии – левомеколь; группа контроля БЦ – гель-пленки с физиологическим раствором; опытная группа – БЦ с 1 % раствором диоксида. Скорость заживления ран оценивали планиметрическим методом [3].

Для исследования гель-пленок БЦ в качестве повязок первой медицинской помощи моделировали проникающие ранение живота с эвентрацией внутренних органов. В стерильных условиях под эфирным наркозом животным (30 беспородных крыс-самцов, массой 200–240 г.) проводили срединную лапаротомию. В лапаратомную рану выводился участок кишечника длиной 10 см, отступая 2 см от превратника. Кишечная петля выдерживалась в течение 4-х часов. В первой группе контроля производилось наложение марлевой салфетки (имитация применения индивидуального перевязочного пакета – первая помощь). Во второй группе дополнительно спустя 2 часа эвентерированный участок кишечника обертывался стерильной марлевой салфеткой, смоченной в вазелиновом масле (этап оказания первой врачебной помощи). В третьей группе на эвентерированную петлю кишечника накладывали гель-пленки БЦ, пропитанные 1 % раствором диоксида. Затем, кишечная петля вправлялась в брюшную полость, которая ушивалась наглухо. Животным всех групп внутримышечно вводили раствор цефазолина.

Крыс выводили из эксперимента через 14 суток путем передозировки эфирного наркоза. Производили вскрытие брюшной полости, оценивали выраженность спаечного процесса как визуально (распространение процесса, деформация органов, вздутие кишечника, наличие выпота в брюшной полости), так и с помощью методики семантического дифференциала (пятибалльная шкала по Липатову В.А.), позволяющей объективно оценить выраженность патоморфологических изменений брюшной полости, обусловленных спаечным процессом [2].

Лабораторные животные были получены из питомника РАМН «Рапполово» (Ленинградская область). Животных содержали в стандартных условиях вивария,

кормление осуществляли *ad libitum* в первой половине дня при свободном доступе к воде. Все опытные и контрольные животные были взяты из одного привоза и прошли карантин в течение 14 суток.

Статистическую обработку результатов проводили с применением программы Statistica 10. Для сравнения средних величин полученных значений и установления достоверности различий со сравниваемыми группами проводили статистическую обработку по непараметрическому тесту множественных сравнений (тест Краскелла-Уоллиса). Различия показателей между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$ и менее.

Результаты и их обсуждение.

В связи с тяжелой моделью термического поражения заживление ран шло медленно и в большинстве случаев полного заживления не удалось достичь даже на 28-е сутки. Динамика уменьшения раневого дефекта представлена в таблице 1. В группе контроля без лечения отмечалась гибель 2-х животных, а общая площадь ран к концу наблюдения снизилась до $67,4 \pm 6,2$ % от исходной. При этом, стоит отметить, что увеличение площади раневого дефекта после первичной хирургической фасциальной некрэктомии ожогового струпа, наблюдаемое во всех экспериментальных группах до 5-х сут. после оперативного вмешательства, в контрольной группе сохранялось до 10-го дня эксперимента.

В группах контроля и левомеколя на ранних сроках наблюдения отмечали фиксацию повязок к ране, при этом их удаление сопровождалось капиллярным кровотечением и травматизацией эпителия. Перевязки в группах гидросорба и БЦ проходили атравматично. Несмотря на ежедневные перевязки с обработкой ран антисептическим раствором, у животных, контрольной группы до 21-х суток отмечали гнойный характер экссудата. В группах левомеколя и БЦ с диоксидином отмечали отсутствие гнойного отделяемого уже с ранних сроков наблюдения.

Таблица 1 – Динамика изменения площади раневого дефекта (в процентах к площади раны после некрэктомии) на фоне применения исследуемых средств, $M \pm m$.

Группа Срок, сут	Контроль без лечения	HydroSorb Hartmann	Левомеколь	БЦ + физ. р-р	БЦ + 1 % р-р диоксида
5	$119,7 \pm 26,0$	$100,0 \pm 8,0$	$94,7 \pm 13,2$	$75,2 \pm 6,2$	$105,6 \pm 18,3$
7	$107,5 \pm 38,2$	$107,8 \pm 48,5$	$86,4 \pm 18,8$	$82,1 \pm 18,7$	$87,3 \pm 26,1$
10	$108,4 \pm 27,3$	$87,2 \pm 33,4$	$61,5 \pm 15,1$	$57,4 \pm 9,7$	$47,1 \pm 13,2^{\#}$
14	$89,3 \pm 41,6$	$82,9 \pm 23,6$	$71,8 \pm 23,2$	$53,5 \pm 7,6$	$51,1 \pm 14,5$

17	63,1±47,8	84,7±24,9	68,3±20,5	54,7±20,0	46,1±13,1
21	71,0±28,6	61,3±6,7	54,5±21,1	47,1±21,6	26,1±6,5 ^{^*}
23	66,1±27,4	57,2±7,8	52,9±20,8	38,7±17,5	21,3±6,6 ^{^*}
28	67,4±6,2	53,7±6,6	50,8±22,3	34,6±16,7	4,4±3,2 ^{#^^*Δ}

Примечания:

- 1 – [#] – различия с контрольными значениями достоверны при $p < 0,05$;
 2 – [^] – различия с группой терапии HydroSorb достоверны при $p < 0,05$;
 3 – ^{^^} – различия с группой терапии HydroSorb достоверны при $p < 0,01$;
 4 – ^{*} – различия с группой терапии левомеколем достоверны при $p < 0,05$;
 5 – ^Δ – различия с группой терапии физ. раствором достоверны при $p < 0,05$.

Наиболее благоприятную клиническую картину отмечали в группе с применением гель-пленок БЦ, содержащих 1 % раствор диоксида. Так, регистрировали достоверное, по отношению к группам контроля и препарата сравнения, сокращение площади ран до $47,1 \pm 13,2$ % от исходной уже на 10-е сутки. Стоит отметить, что наиболее значимые изменения произошли между 7 и 10-ми сутками, что позволило животным данной группы (несмотря на снижение интенсивности процессов ранозаживления до 17-го дня наблюдения – переход раневого процесса во II фазу) осуществить регенерацию за счет краевой эпителизации к 28-м суткам после некрэктомии. Полного замещения раневого дефекта в остальных экспериментальных группах добиться не удалось, что вероятно связано с гибелью в пораженной коже придатков не только за счет первичного термической травмы, но и за счет инфекционных осложнений.

В группе, где применялась гель-пленки БЦ, содержащие диоксидин, наблюдали более раннее завершение воспалительного процесса, отчетливую стимуляцию роста грануляционной ткани и существенную интенсификацию процессов краевой эпителизации. Установлено, что использование гель-пленок БЦ, содержащих антисептический препарат, при местном лечении тяжелых глубоких ожоговых ран III Б степени после хирургической некрэктомии может быть показано не только на этапе подготовки ран к аутодермопластике (без чего заживление в других экспериментальных группах оказалось невозможно), но и в качестве самостоятельного регенеративного средства. Тем не менее, показанное замедление процессов репарации во II фазу раневого процесса позволяет предположить, что применение гель-пленок БЦ во II и III-й фазах раневого процесса можно оптимизировать путем сорбции на раневых покрытиях фармакологических препаратов эффективных при регенерации и организации рубца. Таким образом, использование подобных изделий медицинского назначения

(покрытия для лечения ран) наиболее предпочтительно в рамках II и III уровня системы лечебно-эвакуационного обеспечения.

Исходя из свойств материала, можно предположить, что применение пленок БЦ в качестве повязки первой медицинской помощи при ранениях и травмах живота, сопровождающихся эвентрацией внутренних органов, будет снижать количество осложнений.

У животных с моделированием ранения брюшной полости при вскрытии на 14-е сутки после оперативного вмешательства, в группе контроля, где в первые 4 часа после травмы применялась марлевая повязка, спаечный процесс носил распространенный характер. У части животных отмечали деформацию внутренних органов за счет образования плотных соединительнотканых сращений. Структура спаечного процесса была разнообразной: наблюдали плоскостные, перепончатые, тракционные, шнуровидные и сальниковые спайки. Летальные исходы отмечали на 3-4-е сутки после операций у 3-х животных из группы.

В группе, где спустя 2 часа производили дополнительные мероприятия в рамках объема оказания первой врачебной помощи, через 14 суток после начала эксперимента изменения в брюшной полости были близки к группе контроля. Отмечали менее выраженную деформацию внутренних органов и отсутствие плоскостных спаек.

В экспериментальной группе, с применением пленок БЦ, содержащих антисептический раствор, распространенность спаечного процесса была существенно меньшей. Деформация внутренних органов отсутствовала. Отмечались единичные перепончатые и шнуровидные спайки.

Используя способ оценки спаечного процесса балльным методом семантического дифференциала [2] установлено, что степень тяжести и распространенности спаечного процесса, а также выраженность патоморфологических изменений брюшной полости в экспериментальной группе была достоверно ниже групп контроля и сравнения (таблица 2).

Таблица 2 – Оценка посттравматического спаечного процесса, вызванного ранением живота с эвентрацией внутренних органов методом семантического дифференциала, $M \pm m_M$.

Экспериментальная группа	Сумма баллов
Контроль	1,9±0,2
Стандартная терапия	2,0±0,6
Бактериальная целлюлоза с 1 % раствором диоксида	0,5±0,0 ^{##}

Примечания:

1 – # – различия с контрольными значениями достоверны при $p < 0,05$;

2 – * – различия с группой стандартной терапии достоверны при $p < 0,05$;

Таким образом, установлено, что использование гель-пленок БЦ, содержащих антисептические препараты в качестве повязок первой медицинской помощи на передовых этапах медицинской эвакуации может существенно снизить вероятность возникновения осложнений при травматической эвентрации органов брюшной полости.

В заключение, хочется отметить, что практическое использование материалов на основе БЦ не ограничивается вышеописанными изделиями. Ведутся исследования по разработке гидрогелевых сорбентов, гемостатических средств, прекурсоров хрящевой и костной ткани. При этом, биосинтез БЦ может осуществляться как на стандартных средах, включающих источники углерода, азота, витамины и другие компоненты, так и на средах, являющихся предметом ноу-хау вследствие их более низкой стоимости, но позволяющих получать продукт необходимых свойств. Дальнейшие исследования такого уникального биологического материала несомненно будут вносить дополнительные убедительные доказательства необходимости наличия изделий на его основе на всех уровнях системы лечебно-эвакуационных мероприятий.

Выводы:

1. Местное применение раневых покрытий на основе гель-пленок бактериальной целлюлозы *Gluconacetobacter xylinus*, содержащих раствор антисептического препарата (диоксидин 1 %) оптимизирует раневой процесс при тяжелых обширных термических ожогах в большей степени в I первой фазе, а также обеспечивает заживление ран самостоятельно (без кожной пластики), что невозможно обеспечить аналогами и средствами стандартной терапии.

2. Применение пленок бактериальной целлюлозы *Gluconacetobacter xylinus*, содержащих раствор антисептического препарата (диоксидин 1 %) в качестве повязки первой медицинской помощи предотвращает развитие посттравматической спаечной болезни брюшины при ранениях живота с эвентрацией внутренних органов.

3. Изделия на основе бактериальной целлюлозы в зависимости от сорбированных биологически активных веществ или от формы матрицы могут быть использованы на всех уровнях системы лечебно-эвакуационных мероприятий.

Литература.

1. Баклагина, Ю.Г. Фазовые переходы нативных целлюлоз эволюционно-различных источников в полиморф IV / Ю.Г. Баклагина, А.К. Хрипунов, Д.П. Романов [и др.] // Журнал прикладной химии. - 2012. - Вып. 12. - С. 2038-2045.
2. Липатов, В.А. Обоснование применения геля метилцеллюлозы для профилактики послеоперационного спаечного процесса брюшной полости (экспериментальное исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук / В.А. Липатов. – Курск, 2004. – 148 с.
3. Назаренок, Г.И. Рана. Повязка. Больной. Современные медицинские технологии / Г.И. Назаренок, И.Ю. Сугорова, С.П. Глянцев. – М.: Медицина, 2002. – 472 с.
4. Попов, В.А. Раневой процесс: нанобиотехнологии оптимизации / В.А. Попов. – СПб.: СпецЛит, 2013. – 199 с.
5. Фисун, А.Я. Медицинское обеспечение Вооруженных Сил Российской Федерации: состояние и пути совершенствования / А.Я. Фисун / Воен.-мед. журн. – 2014. – Т. 335, № 1. – С. 4-16.
6. Albaugh, KW. The effect of a cellulose dressing and topical vancomycin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Gram-positive organisms in chronic wounds: a case series / KW. Albaugh, SA. Biely, JP. Cavorsi // *Ostomy Wound Manage.* – 2013. – Vol. 59(5). – P. 34-43.
7. Bi, JC. Morphology and structural characterization of bacterial celluloses produced by different strains in agitated culture / JC. Bi, S. Liu, C. Li, J. Li // *J Appl Microbiol.* – 2014. – Vol. 6. – P. 1-23.
8. Malcolm, B. R. Cellulose: Molecular and Structural Biology, Selected Articles on the Synthesis, Structure, and Applications of Cellulose / B. R. Malcolm [Eds.]. – Springer, 2007. – P. 355.
9. Moriana, R. Correlation of chemical, structural and thermal properties of natural fibres for their sustainable exploitation / R. Moriana, F. Vilaplana, S. Karlsson, A. Ribes // *Carbohydr Polym.* – 2014. – Vol. 112. – P. 422-431.
10. Souza, CM. Regeneration of skin tissue promoted by mesenchymal stem cells seeded in nanostructured membrane / CM. Souza, LA. Mesquita, D. Souza, AC. Irioda // *Transplant Proc.* – 2014. - Vol. 46(6). – P. 1882-1886.
11. Steinbuechel, A. Biopolymers for medical and Pharmaceutical Applications / A. Steinbuechel, R.H. Marchessault - Wiley-Blackwell, 2005. – 1145 p.