

© Чорнопищук Р.М.

УДК: 615.281.9:615.454.1:615.37

Чорнопищук Р.М.

Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, кафедра загальної хірургії (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ КОМПОЗИЦІЇ ПРЕПАРАТІВ ЛЕВОМЕКОЛЬ ТА ЛІАСТЕН В ДОСЛІДАХ "IN VITRO"

Резюме. Проведене вивчення антимікробної активності комбінованого препарату для місцевого лікування гнійних ран у першу фазу ранового процесу, до складу якого входять імуностимулятор мурамілпептидного ряду ліастен та антимікробна мазь на водорозчинній основі левомеколь. Отримані результати підтверджують потенціуючу дію імунотропного препарату на протимікробні властивості цієї мазі та її здатність впливати на біоплівкоутворюючу функцію мікроорганізмів. Отримані результати вказують на перспективність подібного поєднання з можливістю покращення результатів ефективності етіопатогенетичної корекції ранового процесу.

Ключові слова: ліастен, левомеколь, антимікробна активність.

Вступ

Проблема лікування гнійних ран залишається актуальною як в Україні, так і за її межами. Про це вказує значна кількість публікацій, присвячених вивченню цієї проблематики та переконливі статистичні дані. При цьому часто гнійно-запальні захворювання стають причиною розвитку септичних ускладнень або ж основною причиною лікарняної летальності [Велігоцький, Бугаков, 2009]. Не слід забувати і про соціально-економічний аспект цієї проблеми. Хоча на сьогодні відсутні репрезентативні дані про фінансові витрати на лікування, реабілітацію цих хворих в Україні та збитки від їх тимчасової непрацездатності, з літератури відомо, що, наприклад, США за рік витрачає близько одного мільярда доларів на лікування пацієнтів із ранами [Jeffrey, 2007; Whitson, 2007].

Незважаючи на вагомі досягнення у сучасній хірургії та розробку численних методів лікування гнійних ран, відомий принцип комплексного підходу до їх лікування, який передбачає комбінацію хірургічних та медикаментозних методів, не втрачає своєї актуальності [Желіба та ін., 2003]. При цьому важливе місце в лікуванні гнійних ран м'яких тканин займають багатокомпонентні препарати для місцевого застосування, які дозволяють забезпечити максимальну концентрацію активних субстанцій у вогнищі запалення [Даценко та ін., 2007]. При цьому вибір препарату відповідно до фази перебігу ранового процесу є практично відпрацьованим і не переглядався на протязі тривалого часу. Сучасні діагностичні можливості дозволили ширше дослідити перебіг ранового процесу та переглянути етіопатогенетичні принципи медикаментозного лікування гнійних ран [Светухин и др., 1999]. Встановлено, що в патогенезі запалення вагоме місце належить молекулярним та клітинним механізмам імунної системи, стан яких і визначає ефективність лікування та подальший прогноз захво-

рювання [Кабанова, Походенько-Чудакова, 2013; Варюшина и др., 2008]. Тому однією із складових комплексної терапії гнійних ран є імунотерапія препаратами системної та топічної дії [Халилов и др., 2008]. Відсутність вагомих змін показників імунної резистентності організму у хворих при гострій гнійній патології легкого та середнього ступеня важкості на тлі вираженого загальноорганізмового ефекту системних імунотропних препаратів роблять їх використання у таких хворих недоцільним, а інколи і небезпечним [Земсков и др., 2013; Желіба, 1999]. Саме тому в останні роки з'явилась низка праць, присвячених можливості використання імунотропних препаратів у вогнищі ураження, які підтвердили здатність впливати цих препаратів на ефективність лікування і частоту ускладнень [Галимов и др., 2010; Халилов, Снимщикова, 2010; Варюшина и др., 2008; Латюшина, 2008; Снимщиков и др., 2008; Чадаев, Нурписов, 2004; Falanga, 2002; Ковальчук, Ганковская, 1995]. Останнім часом все більше уваги дослідників привертають препарати мікробного походження, а саме імуностимулятори муропептидного з'єднання, які м'яко, різноспрямовано і без побічних реакцій здатні впливати на імунітет [Пащенко и др., 2011]. Одним із таких засобів є вітчизняний препарат з клітинної стінки *Lactobacillus Delbrückii*, який одержав назву "Ліастен" ("Бластен") [Мосієнко та ін., 1999]. Доведена ефективність використання цього препарату при лікуванні гнійної хірургічної інфекції в якості допоміжної терапії з метою відновлення адекватних реакцій імунної системи організму на патологічний процес та активації репаративних процесів [Валтайтис и др., 1996]. При цьому в існуючій літературі відсутня будь-яка інформація про клінічний досвід топічного використання ліастену у рані, в тому числі про його антимікробні властивості та здатність впливати на мікробні біоплівки, як особливу

форму співіснування мікроорганізмів.

Тому *метою* нашого дослідження стало вивчення антимікробних властивостей ліастену та його комбінації з маззю на гідрофільній основі левомеколь та їх вплив на показники біоплівкоутворення *in vitro*.

Матеріали та методи

Для дослідження використовували розчин ліастен 0,00025 г у комбінації з маззю левомеколь 20 г. В якості контролю проводились дослідження антимікробних властивостей кожного із цих компонентів без додавання будь-яких сторонніх речовин.

Антимікробну активність досліджуваних зразків визначали за допомогою методу послідовних серійних розведень їх у рідкому живильному середовищі з визначенням мінімальної бактеріостатичної концентрації (МБсК) (мінімальної концентрації препарату, яка візуально повністю пригнічувала ріст тест-штаму мікроорганізму) та мінімальної бактерицидної концентрації (МБцК) препарату (мінімальної концентрації препарату, яка цілком інактивувала тест-культуру мікроорганізму, що проявлялось відсутністю росту на поживному середовищі), методу дифузії в агар "колодязями" на двох шарах щільного поживного середовища, розлитого в чашки Петрі [Наказ МОЗ України № 167 від 05.04.2007; Волянський та ін., 2004; Даценко и др., 1989]. Для цього, згідно рекомендацій ВООЗ, використовували тест-штами *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Basillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Candida albicans* ATCC 885/653. Мікробне навантаження становило 10⁷ мікробних тіл на 1 мл середовища, що встановлювалось апаратним методом за стандартом McFarland. Для дослідження використовували агар Мюллера-Хінтона.

Оцінка результатів мікробіологічного дослідження методом дифузії в агар проводилась за ступенем затримки росту у зоні нанесення досліджуваної композиції. Для цього застосовували наступні критерії: відсутність зон затримки росту мікроорганізмів навколо лунки, а також затримка до 10 мм вказували на відсутність чутливості мікроорганізму до досліджуваного препарату; зона затримки росту діаметром 10-15 мм вказувала на низьку чутливість культури до дослі-

джуваної концентрації антибактеріальної речовини; зона затримки росту діаметром 15-25 мм розцінювалась як показник чутливості мікроорганізму до досліджуваної лікарської речовини; зона затримки росту більше 25 мм свідчила про високу чутливість мікроорганізму до досліджуваних препаратів [Наказ МОЗ України № 167 від 05.04.2007].

Дослідження впливу препарату на здатність мікроорганізмів формувати біоплівку проводили згідно з методикою Ю. М. Романової та співав. [Романова и др., 2006]. Для цього використовували клінічні штами *Staphylococcus aureus* 8 та *Pseudomonas aeruginosa* 24, виділення та ідентифікація яких проводилась завдяки бактеріологічним методам на основі вивчення їх культуральних, біохімічних та морфологічних досліджень у відповідності із нормативними документами [Приказ минздрава СССР № 535 от 22.04.1985]. Дослідження проводились на 24 та 48 год. Отримані результати дослідження оптичної щільності приймали за критерії здатності до утворення біоплівок: < 0,120 у.о. - відсутня здатність до утворення біоплівок, 0,120-0,240 у.о. - середня здатність, > 0,240 у.о. - висока здатність [Романова и др., 2006].

Статистичне опрацювання результатів здійснювали з використанням комп'ютерної програми STATISTICA 6.1.

Результати. Обговорення

Аналізуючи отримані дані, вдалось встановити, що сам препарат ліастен володіє низькою антимікробною активністю. Проте результати порівняння антимікробної активності мазі левомеколь та її комбінації з імуномодельючим препаратом ліастен, наведені у таблиці 1 та таблиці 2, підтвердили згубну дію останніх по відношенню до досліджуваних штамів мікроорганізмів, та дозволили встановити відмінності у рівнях протимікробної активності досліджуваних зразків.

Так при порівнянні діапазону отриманих показників встановлено, що комбінація препаратів ліастен та левомеколь має більш виражену антистафілококову дію у порівнянні із маззю левомеколь. Визначено також різницю між діапазоном показника МБсК у досліджуваній та контрольній групах по відношенню до *Escherichia coli* ATCC 25922 і *Pseudomonas aeruginosa*

Таблиця 1. Антибактеріальні властивості мазі левомеколь та її комбінації із препаратом ліастен (метод серійних розведень) (мг/мл).

Досліджуваний зразок	Вид мікроорганізму											
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636		<i>Basillus subtilis</i> ATCC 6633		<i>Candida albicans</i> ATCC 653/885	
	МБсК	МБцК	МБсК	МБцК	МБсК	МБцК	МБсК	МБцК	МБсК	МБцК	МБсК	МБцК
Левомеколь	5,0-8,0	7,0-10,0	8,0 -15,0	10,0-15,0	8,0-12,0	10,0-15,0	10,0 -15,0	10,0-15,0	2,0-5,0	5,0-8,0	≥100	≥120
Левомеколь 20,0 + Ліастен 0,00025	3,0-6,0	5,0-8,0	8,0 -12,0	10,0-15,0	6,0-10,0	10,0-15,0	10,0 -15,0	10,0-15,0	2,0-5,0	5,0-8,0	≥80	≥100

Таблиця 2. Антибактеріальні властивості мазі левомеколь та її комбінації із препаратом ліастен (метод дифузії в агар) (мм).

Досліджуваний зразок	Вид мікроорганізму					
	Staphylococcus aureus ATCC 25923	Escherichia coli ATCC 25922	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Proteus vulgaris ATCC 4636	Basillus subtilis ATCC 6633	Candida albicans ATCC 653/885
Левомеколь	24,0±0,36	23,0±0	22,33±0,21	21,33±0,21	25,0±0	13,33±0,21
Левомеколь 20,0 + Ліастен 0,00025	25,33±0,21*	25,0±0,36*	25,33±0,21*	23,33±0,21*	27,33±0,21*	13,67±0,21

Примітка. * - достовірна різниця ($p \leq 0,05$) між даним показником та показником, визначеним для мазі без комбінації.

Таблиця 3. Рівень біоплівкоутворення штамів Staphylococcus aureus 8 та Pseudomonas aeruginosa 24 під впливом досліджуваних антимікробних засобів (у.о.).

Досліджуваний зразок		Вид мікроорганізму	
		Staphylococcus aureus 8	Pseudomonas aeruginosa 24
Левомеколь	24 год.	0,085-0,098	0,134-0,147
Левомеколь 20,0 + Ліастен 0,00025		0,074-0,086	0,145-0,165
Левомеколь	48 год.	0,065-0,078	0,098-0,115
Левомеколь 20,0 + Ліастен 0,00025		0,049-0,068	0,089-0,107

ATCC 27853.

Встановлено також різницю у величині діаметру затримки росту мікроорганізмів у контрольній та досліджуваній групах (табл. 2).

Штами мікроорганізмів Staphylococcus aureus ATCC 25923, Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Proteus vulgaris ATCC 4636, Basillus subtilis ATCC 6633 виявили статистично достовірну вищу чутливість до дії запропонованої композиції (зона затримки росту перевищувала 23-25 мм). Виключення становила лише Candida albicans ATCC 653/885, діаметр затримки росту якої не відрізнявся

Список літератури

- Бластен - новий вітчизняний імуномодулятор біологічного походження / В. С. Мосієнко, М. Д. Мосієнко, З. Д. Савцов [та ін.] // Журнал АМН України. - 1999. - Т. 5, № 1. - С. 79-86.
- Велігоцький М. М. Сучасні методи в лікуванні хворих з гнійними рановими процесами / М. М. Велігоцький, І. Є. Бугаков // Український журнал хірургії. - 2009. - № 1. - С. 22-23.
- Волянський Ю. Л. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів: метод. рекомендації / Волянський Ю. Л., Гриценко І. С., Широкобоков В. П. - Київ, 2004. - 38 с.
- Желіба М. Д. Вплив гнійної інфекції на неспецифічний захист організму та його корекція / М. Д. Желіба // Інфекційні хвороби. - 1999. - № 4. - С. 39.
- Желіба М. Д. Місцева медикаментозна підтримка під час хірургічного лікування гнійного запалення / М. Д. Желіба, В. Г. Палій, В. П. Ковальчук // Клінічна хірургія. - 2003. - № 6. - С. 38-40.
- Использование интерлейкина-1 β для местного лечения гнойно-некротических поражений нижних конечностей / Е. А. Варюшина, В. В. Москаленко, Т. П. Лебедева [и др.] // Медицинская иммунология. - 2008. - Т. 10, № 4-5. - С. 439-448.
- Кабанова А. А. Гнойно-воспалительные процессы челюстно-лицевой области и шеи. Современные подходы к диагностике, прогнозированию и лечению / А. А. Кабанова, И. О. Походенько-Чудакова // Военная медицина. - 2013. - № 3. - С. 8-14.
- Ковальчук Л. В. Иммуноцитокіни і локальна іммунокорекція / Л. В. Ковальчук, Л. В. Ганковська // Иммунология. - 1995. - № 1. - С. 4-7.
- Комплексная иммунотерапия - перспективный метод лечения гнойно-воспалительных заболеваний / А. М. Земсков, И. И. Журихина, Г. В. Добросоцких [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. - 2013. - Т. 20, № 1. - С. 152-154.
- Латюшина Л. С. Клинико-иммунологическая оценка локальной иммунотерапии Ронколейкином в комплексном лечении больных с флегмонами челюстно-лицевой области / Л. С. Латюшина // Вестник новых медицинских технологий. - 2008. - Т. XV. - № 2. - С. 182-185.
- Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) изучению лекарственных препаратов для местного лечения гнойных ран / [Даченко Б. М., Бирюкова С. В., Тамм Т. И., Кушаева Д. Н.]. - М., 1989. - 46 с.
- Наказ МОЗ України "Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів" від

від контрольної групи.

Результати вивчення впливу досліджуваних антимікробних препаратів на здатність мікроорганізмів формувати біоплівку наведені у таблиці 3.

Визначено зниження показника здатності досліджуваних штамів Staphylococcus aureus 8 (24 та 48 год.) та Pseudomonas aeruginosa 24 (48 год.) формувати біоплівку на тлі використання композиції препаратів ліастен та левомеколь у порівнянні із контрольним зразком.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Поєднання ліастену із антимікробною маззю на гідрофільній основі левомеколь дозволяє потенціювати протимікробну активність останньої та негативно впливати на біоплівкоутворюючу функцію мікроорганізмів. Запропонована композиція, яка передбачає поєднання ліастену 0,00025 г та мазі левомеколь 20 г, володіє багатовекторною дією, що робить її перспективним засобом для місцевого лікування гнійних ран у першу фазу ранового процесу.

У перспективні планується проведення досліджень для встановлення ефективності лікування гнійних ран "in vivo".

- 05.04.2007 № 167.
Патогенетическое обоснование местного лечения очагов гнойной инфекции / Б. М. Даценко, Т. И. Тамм, С. Г. Белов [и др.] // Клінічна хірургія. - 2007. - № 11-12. - С. 19-20.
- Приказ минздрава СССР об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений от 22.04.85 № 535.
- Применение ликопида, активекса и дерината для лечения гнойных заболеваний м'яких тканей у работников предприятия нефтехимического комплекса / О. В. Галимов, Т. З. Закиев, С. В. Туйсин [и др.] // Казанский медицинский журнал. - 2010. - Т. 91, № 3. - С. 384-386.
- Результаты фазы I клинических испытаний иммуномодулятора полимурамила / М. В. Пашенко, А. С. Бухина, Н. М. Голубева [и др.] // Иммунология. - 2011. - № 6. - С. 315-321.
- Современные подходы к диагностике и лечению гнойно-воспалительных заболеваний и раневой инфекции / И. А. Снимщикова, М. А. Халилов, А. И. Медведев [и др.] // Вестник РГМУ. - 2008. - № 4. - С. 95-98.
- Способность к формированию биопленок в искусственных системах различных штаммов Salmonella typhimurium / Ю. М. Романова, Н. В. Алексеева, Т. А. Смирнова [и др.] // Журнал микробиологии. - 2006. - № 4. - С. 38-42.
- Халилов М. А. Опыт использования локальной иммунокоррекции в лечении гнойных ран / М. А. Халилов, И. А. Снимщикова // Медицинская иммунология. - 2010. - Т. 12, № 3. - С. 227-234.
- Чадаев А. П. Иммуномодуляторы Иммуномакс и Гепон в комплексном лечении больных с острой гнойной хирургической инфекцией / А. П. Чадаев, А. М. Нурписов // Фарматека. - 2004. - № 16. - С. 89-94.
- Этиопатогенетические принципы хирургического лечения гнойных ран / А. М. Светухун, В. М. Матасов, В. Г. Истратов [и др.] // Хирургия. - 1999. - № 1. - С. 9-12.
- Falanga V. Wounding of bioengineered skin: cellular and molecular aspects after injury / V. Falanga, C. Isaacs, D. Paquette // Journal of Investigative Dermatology. - 2002. - Vol. 119, № 3. - P. 653-660.
- Jeffrey A. Clinical experience using ultrasonic-assisted wound treatment / A. Jeffrey, M. Kathleen, R. Nelson // Wounds. - 2007. - Vol. 15, № 4. - P. 32-34.
- Whitson R. High resolution ultrasound imaging in wound healing / R. Whitson, J. Melhuish, K. Harding // Wounds. - 2007. - Vol. 5, № 3. - P. 116-121.

Чернопищук Р. Н.

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ КОМПОЗИЦИИ ПРЕПАРАТОВ ЛЕВОМЕКОЛЬ И ЛИАСТЕН В ОПЫТАХ "IN VITRO"

Резюме. Проведено изучение антимикробной активности комбинированного препарата для местного лечения гнойных ран в первую фазу раневого процесса, в состав которого входят иммуностимулятор мурамилпептидного ряда лиастен и антимикробная мазь на водорастворимой основе левомеколь. Полученные результаты подтверждают потенцирующее действие иммуностропного препарата на противомикробные свойства этой мази и ее способность влиять на функцию микроорганизмов образовывать биопленку. Полученные результаты указывают на перспективность подобного сочетания с возможностью улучшения результатов эффективности этиопатогенетической коррекции раневого процесса.

Ключевые слова: лиастен, левомеколь, антимикробная активность.

Chornopyshchuk R. M.

STUDY OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE COMBINATION OF LEVOMEKOL AND LIASTENUM USING IN VITRO EXPERIMENTS

Summary. The research of antimicrobial activity of the combined medicament which contains immunomodulator of muramylpeptide series liastenum and antimicrobial ointment on the basis of water-soluble Levomecol for the local treatment of purulent wounds during the first phase of wound healing process was conducted. The obtained results confirm potentiating effect of the immunotropic medicament on antimicrobial functions of the ointment and its abilities to affect on the function of the microorganisms to form biofilms. The given results indicate the potentiality of this combination and the possibility of improving the results of the wound process etiopatogenetic correction.

Key words: Liastenum, Levomecol, antimicrobial activity.

Стаття надійшла до редакції 01.12.2014 р.

Чернопищук Роман Миколайович - магістрант кафедри загальної хірургії Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова; +38 097 2128963; ro_man@mail.ru