

# **Новый способ прогнозирования течения гнойных ран**

## **Научный коллектив**

Проект разрабатывается научным коллективом кафедры факультетской хирургии и кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО ОрГМА Минздрава России:

1. Стадников А. А., доктор биологических наук, профессор, Заслуженный деятель науки Российской Федерации, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии – руководитель проекта.
2. Нузова О. Б., доктор медицинских наук, профессор – руководитель проекта
3. Студеникин А. В., аспирант кафедры факультетской хирургии
4. Прудников А. В., кандидат медицинских наук, врач-хирург
5. Узоян Д. М., студент 5 курса лечебного факультета

## **Соответствие проекта тематике заявленной научной платформы**

Данный проект соответствует тематике «Инновационные фундаментальные технологии в медицине», в работе использованы данные экспериментальных исследований. Разработан новый способ прогнозирования течения гнойных ран.

## **Актуальность проблемы**

Лечение гнойно-воспалительных процессов мягких тканей является одной из важнейших проблем хирургии (Кузин М.И. с соавт., 1991; Глянцев С.П., Павлов, В.В., 1998; Белоконев, В.И., Измайлов, Е.П., 2005, 2009; Оболенский В.Н., 2013). Постоянное внимание к этой проблеме объясняется увеличением гнойно-воспалительных заболеваний, тяжестью их течения, прогрессирующим возрастанием антибиотикоустойчивых и антибиотикозависимых штаммов микробов (Стручков В.И., 1987; Бубнова

Н.А. с соавт., 1989; Светухин А.А. с соавт., 2004; Митиш В.А. с соавт., 2012; Нузов Б.Г. с соавт., 2012; Keztesz I. et al., 1983; Koseoglu H., 2006). Среди всех хирургических больных раневая инфекция встречается у 35-45% (Блатун Л.А., 2011).

Успех лечения больных с гнойной хирургической инфекцией во многом зависит от местного лечения. Однако применяемый в настоящее время большой арсенал методов и средств не всегда обеспечивает желаемый результат. Поэтому важен поиск новых методов и средств местного лечения, обладающих разносторонним воздействием, обеспечивающим антимикробный, противовоспалительный и репаративный эффект (Егоров В.А., 2001; Ефименко Н. А. с соавт., 2004; Нузова О.Б., 2012; Conley J., 2003).

Таким требованиям обладает разработанный в ГБОУ ВПО «Оренбургская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации препарат милиацил – просяное масло (*Miliacylum*).

Работами Л.Е. Олифсона с соавт. (1979, 1989) и Б.Г. Нузова (1990, 1991, 1997) установлено, что лечебный эффект милиацила обусловлен наличием в нем ряда биологически активных соединений: ненасыщенные жирные кислоты, особенно линолевая и линоленовая, токоферолы, каротиноиды – каротины, ксантофиллы, стероиды – милиацин, эргостерин, ситостерин. Однако не до конца изучены изменения в тканях гнойных ран при использовании милиацила в аспектах ультраструктурного и молекулярно-генетического анализа (апоптоз).

Одной из причин неблагоприятного течения инфекционных заболеваний считается инфицирование возбудителем, способным секретировать биологически активные вещества, инактивирующие защитные механизмы хозяина и оцениваемые, как факторы бактериальной персистенции (Бухарин О.В., 1999; Курлаев П.П., 2001). Антилактоферриновая активность микроорганизмов является фактором персистенции бактерий, способствующими выживанию в организме хозяина (Валышева И.В., 2005). Многие патогенные бактерии обладают механизмами, направленными на управление клеточной гибелью, что позволяет им поддерживать

оптимальные условия развития инфекции. Механизмы индукции и подавления апоптоза, выработанные бактериями, весьма разнообразны, они реализуются в результате сложного взаимодействия биологически активных бактериальных молекул с конкретными мишенями сигнальных путей, ведущих к апоптозу (Зигангирова Н. А. с соавт., 2004).

Прогнозирование характера течения раневого процесса позволяет предпринять меры по предупреждению неблагоприятных осложнений, улучшить результаты лечения.

### **Цель и задачи исследования**

Цель исследования – разработать новый способ прогнозирования течения гнойных ран на основе иммуноцитохимической идентификацию экспрессии проапоптотических белков p53, caspase 3 и экспрессии антиапоптотических белков bcl-2, ki-67 в экспериментальных условиях.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Сравнить влияние различных методов консервативного местного лечения (милиацил, 1% раствор диоксидина и облепиховое масло) на заживление гнойных ран в экспериментальных условиях.

2. Установить особенности динамики гистологических изменений в тканях гнойных ран под влиянием указанных методов лечения в зависимости от персистентных свойств золотистого стафилококка (*S.aureus* с антилактоферриновой активностью АЛФА<sup>+</sup> и без таковой АЛФА<sup>-</sup>).

3. Установить на экспериментальном материале иммуноцитохимическую идентификацию экспрессии проапоптотических белков p53, caspase-3, антиапоптотического белка bcl-2, а также белка Ki-67 - маркера пролиферации, для оценки характера и выраженности репаративных гистогенезов.

### **Материалы и методы исследования**

Экспериментальные исследования проведены на 72 лабораторных беспородных крысах – самцах массой 230–280 г на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО ОрГМА Минздрава России (зав.

кафедрой – з.д.н. РФ, проф. Стадников А.А.). Микробиологические исследования выполнены в лаборатории по изучению механизмов и регуляции персистенции бактерий Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (директор – д.м.н. Черкасов С.В., заведующая лабораторией – д.б.н. Карташова О.Л.).

У крыс моделировали раневой процесс задних конечностей, из них 36 крыс были инфицированы *S.aureus* с антилактоферриновой активностью (АЛФА<sup>+</sup>) и 36 – штаммом стафилококка без антилактоферриновой активности (АЛФА<sup>-</sup>).

Экспериментальные исследования на животных выполнялись с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» согласно приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 года, Федеральному закону РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.12.1999, «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей» (Страсбург, 1985).

Экспериментальную модель гнойной раны воспроизводили следующим образом: подопытным крысам после удаления волосяного покрова и обработки кожи настойкой йода и спиртом в стерильных условиях внутримышечно вводился 1 мл взвеси суточной культуры стафилококка (2 млрд. микробных тел) и 0,25 мл 25% сульфата магния. Указанная выше доза вводимой культуры выбрана нами опытным путем. Аналогичные дозы вводимой культуры использовались и другими авторами (Толстых П.И., 1977; Муравко Л.С., 1983; Нузов Б.Г., 1991; Нузова О.Б., 2010). Сульфат магния применен в связи с тем, что помимо микроорганизмов в образовании гнойного очага большое значение имеет наличие некробиотических тканей (Жадинский Н.В. с соавт., 1989).

Через 5–7 дней у подопытных животных возникал гнойный очаг. После получения экспериментальной модели гнойно-воспалительного очага производили его хирургическую обработку в объеме, обеспечивающем удаление нежизнеспособных тканей. Оперативное вмешательство проводилось под общей анестезией.

Крысы были разделены на три группы: основную, первую контрольную и вторую контрольную. В каждой группе было по 24 крысы ( из них 12 крыс инфицированы *S.aureus* АЛФА<sup>+</sup> и 12 крыс *S. aureus* АЛФА<sup>-</sup>).

У крыс основной группы в местном лечении ран использовали милиацил по 0,3 мл ежедневно, затем накладывали марлевую повязку. В первой контрольной группе животных был исследован характер течения гнойно-воспалительного процесса без лечебной коррекции. Во второй контрольной группе применяли повязки с 1% раствором диоксидина в течение 8–10 дней для очищения ран от гнойно-некротических масс и наносили по 0,3 мл облепихового масла.

Динамику течения патологического процесса оценивали по клиническим признакам – срокам исчезновения инфильтрации и гиперемии краев раны, характеру и количеству раневого отделяемого, срокам очищения ран от гнойно-некротического содержимого, срокам появления грануляций, краевой эпителизации и заживления. Измерение площади ран (планиметрия) проводили, используя метод Л.Н. Поповой (Кузин М.И, Костюченко Б.М., 1981).

У животных основной и контрольных групп выполнены исследования состава микрофлоры гнойных ран по общепринятой методике (Приказ МЗ СССР № 535 от 22.04.85) перед началом лечения, на седьмой день и по окончании лечения. Проводили забор материала в стерильные одноразовые контейнеры с последующей его микроскопией и бактериологическим исследованием на средах: 5% кровяной агар и желточно-солевой агар. Идентификацию стафилококков проводили с использованием тест-систем «STAPHYtest 24» (Lachema, Чехия). Другие выделенные микроорганизмы идентифицировали до рода. Антилактоферриновую активность определяли по методике О.В.Бухарина с соавт. (2005).

У подопытных животных в динамике течения раневого процесса оценивали противовоспалительное и репаративное воздействие различных способов лечения. Выполняли гистологические и гистохимические исследования ткани из края ран на 3–й, 7–й, 14–й и 21–й день лечения после эвтаназии крыс.

Для идентификации клеток с признаками апоптоза (программированной гибели клеток) в регенерате гнойных ран использовали иммуноцитохимические реакции. Для определения экспрессии проапоптотического белка p 53, а также антиапоптотических белков ki-67 и bcl-2, серийные гистосрезы (толщиной 5–6 мкм) инкубировали с соответствующими моноклональными антителами (фирма «Dako», Дания) в рабочем разведении 1:50. Для определения экспрессии проапоптотического белка caspase-3 («Sigma-Aldrich», США) использовали рабочее разведение 1:100. Для визуализации структур использовали стретавидин-биотиновый пероксидазный метод (Dako LSAB-kit, Дания) с дополнительным окрашиванием ядер клеток гематоксилином Майера. Для определения внутрифазной фрагментации ДНК использовали набор реактивов «ApopTag Plus Peroxidase in Situ Apoptosis Detection Kit» (фирма «Intergen», Канада). Визуализацию ядер проводили 0,5% раствором метиленового зеленого на 0,1 М ацетатном буфере. При постановке Apoptag теста ядерный хроматин клеток, вступивших в апоптоз, приобретал коричневое окрашивание. Все иммуноцитохимические реакции были проведены согласно рекомендациям А.П. Киясова (2001). Во всех случаях подсчитывали процент окрашенных (иммунопозитивных) клеток, исходя из анализа не менее 1000 клеток в случайно выбранных полях зрения серийных гистопрепаратов.

Полученные данные были обработаны на ЭВМ с помощью программы «Статистика 6.1». Количественные признаки были подвергнуты статистической обработке путём подсчёта основных статистических характеристик: выборочного среднего, ошибки среднего (стандартной ошибки). Данные, полученные в результате исследования, анализировались с применением непараметрических методов статистики согласно рекомендациям (Гублер Е.В., Генкин А.А., 1973; Лакин Г.Ф., 1990; Боровиков В.П., 2003). В качестве непараметрических критериев применялись: критерий Вилкоксона (в случае зависимых выборок) и критерий Манна-Уитни (в случае независимых выборок). В качестве параметрического критерия использовался t-критерий Стьюдента.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Результаты экспериментальных исследований проведенные на 72 белых беспородных крысах-самцах свидетельствует о том, что более эффективным оказалось использование милиацила при местном лечении гнойных ран, чем применение 1% раствора диоксидина и облепихового масла (таб.1).

При лечении милиацилом гнойных ран крыс основной группы на третьи сутки выявлялось значительное очищение их от гнойно–некротических масс, появление розовых грануляций. Было обнаружено уменьшение воспалительного процесса в окружающих тканях. На седьмые сутки лечения содержимое ран было скудным, серозного характера. Дно и стенки ран покрывались сочными грануляциями, наблюдалось появление краевой эпителизации. Значительно уменьшались размеры ран. К 10 суткам лечения раны животных заживали.

У крыс первой контрольной группы лечение ран не проводилось, гнойно-воспалительный процесс развивался по общеизвестным принципам. Заживление ран у крыс первой контрольной группе не происходило к 21 суткам.

У животных второй контрольной группы на третьи сутки, леченных местно 1% диоксидином наблюдалось сохранение гнойно-некротических масс. На седьмой день лечения происходило снижение воспалительного процесса, раны были заполнены зернистыми грануляциями. На 14 сутки лечения хорошо видна краевая эпителизация, раны значительно уменьшались в размерах. Длительность заживления ран составляла 16 дней

Таблица 1

**Результаты лечения гнойных ран крыс в зависимости от характера  
местного воздействия и свойств стафилококков**

Группы крыс	M±m      Сроки (в днях)				
	Стафилококк	очищение ран	появление грануляций	начало эпителизации	заживление
Первая контрольная группа (без лечения)	АЛФА <sup>+</sup>	9,3 ± 0,3***	8,3 ± 0,3****	10,7 ± 0,4**	На 21 сутки не происходило заживления ран
	АЛФА <sup>-</sup>	7,5 ± 0,3***	6,2 ± 0,2***	9,0 ± 0,3***	
Вторая контрольная группа (диоксидин и облепиховое масло)	АЛФА <sup>+</sup>	6,9 ± 0,3**	5,8 ± 0,3**	8,5 ± 0,2**	17,3 ± 0,3*
	АЛФА <sup>-</sup>	6,4 ± 0,2***	5,6 ± 0,2***	8,2 ± 0,2***	15,7 ± 0,3*
Основная группа (милиацил )	АЛФА <sup>+</sup>	4,6 ± 0,2	4,1 ± 0,2	7,2 ± 0,2	10,8 ± 0,3*
	АЛФА <sup>-</sup>	4,3 ± 0,2	3,9 ± 0,2	6,6 ± 0,2	9,2 ± 0,3

Примечание:

- \* - достоверность различий показателей от таковых основной группы (p<0.05)
- \*\* -достоверность различий показателей от таковых основной группы (p<0.01)
- \*\*\* -достоверность различий показателей от таковых основной группы (p<0.001)
- \* - достоверность различий показателей в зависимости от штамма стафилококка (p<0.05)
- \*\* - достоверность различий показателей в зависимости от штамма стафилококка (p<0.01)



О наиболее значительном воздействии милиацила на процессы заживления ран свидетельствуют и проведенные в динамике исследования площади ран (таблица 2).

Таблица 2

**Динамика уменьшения площади гнойных ран у крыс трех групп**

Группы крыс	Площадь ран (мм <sup>2</sup> )									
	До лечения	7 день лечения			14 день лечения			21 день лечения		
	M±m	M±m	% уменьшения к исходному	% уменьшения за сутки	M±m	% уменьшения к исходному	% уменьшения за сутки	M±m	% уменьшения к исходному	% уменьшения за сутки
Основная группа n =24	272,4 ±1,4	160,2±1,5	41,2	5,9	-	-	-	-	-	-
I Контрольная группа n =24	269,3 ±1,1	254,1±0,9**	5,6	0,8	137,7±1,8*	48,9	6,5	64,2±2,9	76,2	7,6
II Контрольная группа n =24	272,2 ±0,9	225,8±0,7*	17,0	2,43	71,2±1,0	73,8	9,8	-	-	-

Примечание:

\* – показатели, достоверно отличающиеся от контрольных групп при применении милиацила ( $p<0,001$ ).

\* – показатели, достоверно отличающиеся первой и второй контрольных групп ( $p<0,001$ ).

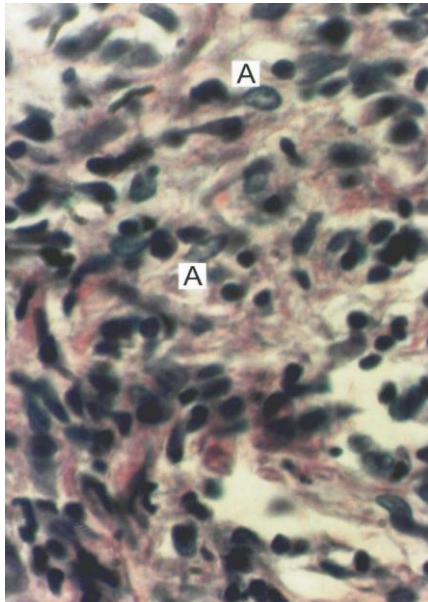
Анализ исследованных объектов у животных на гистологическом уровне, которые не подвергались лечебной коррекции, показал, что в целом морфологические изменения в раневой области полностью укладывались в картину общеизвестного течения раневого процесса (альтерация тканевых структур, экссудация, пролиферация малодифференцированных клеток).

Экспериментальный гнойный процесс, вызванный золотистым стафилококком с антилактоферриновой активностью носил более затяжной характер и характеризовался появлением значительных участков некротизированных тканей кожи и прилежащих мышц, наличием большого числа гранулоцитов (преимущественно нейтрофилов), находящихся в состоянии дегенерации (кариопикноз, кариолизис) и цитолиза, по сравнению

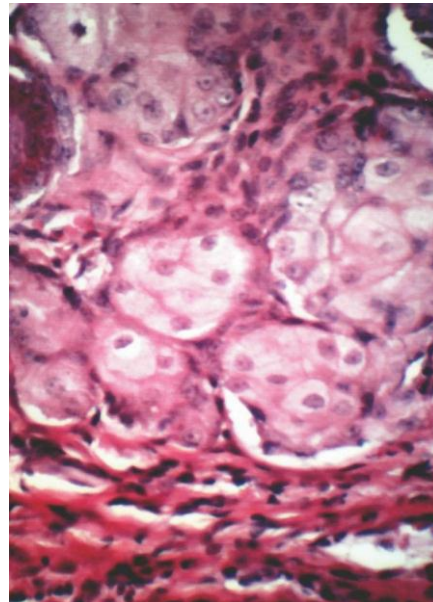
с раневым процессом крыс, вызванных золотистым стафилококком без антилактоферриновой активности.

Во второй контрольной группе в области ран воспалительный процесс носил пролонгированный характер, а фазы нагноения и очищения ран были значительно затянуты. Очищение ран было замедлено, слабо была выражена мобилизация макрофагов.

При этом нашими светооптическими и электронномикроскопическими исследованиями было показано, что применение милиацила, по сравнению с доксидином и облепиховым маслом, обеспечивало оптимизацию фаз репаративных гистогенезов в раневой зоне, инфицированной штаммами стафилококка, в том числе обладающих антилактоферриновой активностью (АЛФА<sup>+</sup>). Так применение милиацила достоверно уменьшало некротические и некробиотические процессы в тканях. Были получены дополнительные ультроструктурные доказательства, свидетельствующие о регенераторном и мембранопротекторном действии милиацила. Так на стадиях альтерации и экссудации воспалительного процесса выявлены усиление лейкоцитарной инфильтрации и макрофагальной реакции, ускоряется купирование воспалительного процесса и отделение некротических масс. Существенно снижалась квота деструктивно измененных лейкоцитов, уменьшалась количество фибробластов и пикнотизированных эндотелиоцитов. Достоверно возрастала активность макрофагов. Более активным (в том числе при инфицировании стафилококком АЛФА<sup>+</sup>) оказалось формирование грануляционной (малодифференцированной соединительной) ткани за счет интенсификации васкулогенеза, мобилизации адвентициальных клеток и фибробластов. При этом интенсивное образование грануляционной ткани сопровождалось ускорением эпителизации поверхности раневого дефекта. Новообразованные эпителиальные пласты носили органотипический характер с последующим формированием дериватов кожи (рис. 2,3).



**Рис. 2.** Малодифференцированная (грануляционная) соединительная ткань в зоне раневого дефекта у крысы, инфицированной золотистым стафилококком с антилактоферриновой активностью через 7 суток лечения милиацилом. А-фибробласты. Фиксация: спирт- формол. Окраска: перйодат-Шифф-реакция (контроль с амилазой). Ув.: об. 40, ок. 10.



**Рис. 3.** Новообразованные слюнные железы в регенерате у крысы, инфицированной золотистым стафилококком с антилактоферриновой активностью на 7 день лечения милиацилом. Фиксация: спирт-формол. Окраска: гематоксилин – эозин. Ув.: об. 40, ок. 10.

О более благоприятном воздействии милиацила на заживление гнойных ран по сравнению с 1%раствором диоксидина и облепихового масла подтверждалось иммуноцитохимическими исследованиями (табл. 3, 4). Количество bcl-2 положительных эпителиоцитов у крыс основной группы инфицированных золотистым стафилококком с антилактоферриновой активностью увеличивалось на 3 сутки по сравнению с таковым показателем животных второй контрольной группы в 1,6 раза, на 7 сутки соответственно в 4,7 раза. Количество bcl-2 положительных клеток фибробластов у крыс основной группы, инфицированных золотистым стафилококком с антилактоферриновой активностью увеличивалось в 2,4 раза, по сравнению с аналогичным показателем животных второй контрольной группы, на 7 сутки был также выше соответственно в 1,8 раза. У крыс первой контрольной группы bcl-2 положительные эпителиоциты, фибробласты обнаружены не были на 3 и 7 сутки. У животных, инфицированных

золотистым стафилококком без антилактоферриновой активностью увеличивалось количество bcl-2 положительных эпителиоцитов на 3 сутки в сравнении с таковым показателем первой и второй контрольных групп в 3,7 и 1,1 раза, на 7 сутки соответственно в 3,8 раза по сравнению с второй контрольной группой. У животных первой контрольной группы bcl-2 положительные эпителиоциты определены не были. Данный показатель у фибробластов основной группы был выше, чем у первой и второй контрольных групп в 5,5 и 2,9 раза на 3 сутки, на 7 сутки в 1,7 раза в сравнении с данным показателем второй контрольной группы, bcl-2 положительные фибробласты не выявлялись у животных первой контрольной группы.

Полученные данные можно интерпретировать с позиций концепции о программированной клеточной гибели (Новиков В.С., 1996), согласно которой белок p53 является транскрипционным фактором, регулирующим прохождение клеточного цикла через G1 фазу (образно говоря, осуществляется «арест» жизненного цикла клетки). Экспрессия же синтеза протеина bcl-2 ингибирует образование в клетках протеина p53, а следовательно вступление их в апоптоз.

Таблица 3

**Морфометрические данные по анализу некротических процессов  
и содержание иммунопозитивных клеток (%) в ране  
экспериментальных животных, инфицированных *S.aureus* без  
антилактоферриновой активности (АЛФА-) в зависимости от способа  
их лечения (подсчет проведен с помощью сетки  
Г.Г. Автандилова, об. 40, ок. 10). Измерения проводили не менее  
10 полей зрения микроскопа МБИ-15.**

% содержания иммунопозитивных клеток		M±m 3 сут.			M±m 7 сут.		
		без лечения	милиацил	диоксидин, и облепиховое масло	без лечения	милиацил	диоксидин, и облепиховое масло
эпителиоциты	P53	2,8±0,02***	1,9±0,02	2,6±0,04***	1,9±0,01***	1,7±0,01	2,1±0,03***
	Caspasa 3	4,0±0,01***	2,2±0,01	2,9±0,02***	3,7±0,01***	1,9±0,02	3,1±0,04***
	bcl 2	0,9±0,01***	3,0±0,01	2,7±0,01***	—	3,4±0,03	0,9±0,01***
	Ki 67	—	2,9±0,01	0,9±0,01***	—	4,1±0,01	1,9±0,01***
фибробласты	P53	3,3±0,04***	2,1±0,01	3,0±0,01***	2,0±0,04***	1,5±0,02	3,1±0,09***
	Caspasa 3	5,1±0,07***	3,0±0,04	4,9±0,06***	3,7±0,01***	3,1±0,03	4,9±0,01***
	bcl 2	0,8±0,01***	4,4±0,09	1,5±0,01***	—	4,9±0,03	2,9±0,03***
	Ki 67	—	3,7±0,03	2,9±0,01***	—	3,9±0,01	2,8±0,02***

Примечание: \*\*\* –  $p \leq 0,001$  степень статистической достоверности различий показателей по сравнению с таковыми основной группы (милиацил).

Количество p53 положительных эпителиоцитов у крыс основной группы инфицированных золотистым стафилококком с антилактоферриновой активностью уменьшалось на 3 сутки по сравнению с таковым показателем животных первой и второй контрольных групп в 2,3 раза и 1,6 раза, на 7 сутки этот показатель был также ниже у крыс основной группы по сравнению с контрольными группами соответственно в 4,6 и 2,6 раза. Уменьшалось количество p53 положительных фибробластов у крыс основной группы по сравнению с животными первой и второй контрольных групп в 2 и 1,3 раза, этот показатель на 7 сутки был также меньше у крыс основной группы по сравнению с контрольными группами соответственно в 2,9 и 1,8 раза.

Таблица 4

**Морфометрические данные по анализу некротических процессов и содержание иммунопозитивных клеток (%) в ране экспериментальных животных, инфицированных *S.aureus* с антилактоферриновой активности (АЛФА<sup>+</sup>) в зависимости от способа их лечения (подсчет проведен с помощью сетки Г.Г. Автандилова, об. 40, ок. 10). Измерения проводили не менее 10 полей зрения микроскопа МБИ-15.**

% содержания иммунопозитивных клеток		M±m 3 сут.			M±m 7 сут.		
		без лечения	милиацил	диоксидин и облепиховое масло	без лечения	милиацил	диоксидин и облепиховое масло
эпителиоциты	P53	4,2±0,03***	1,8±0,01	2,9±0,04***	5,5±0,03***	1,2±0,01	3,1±0,05***
	Caspasa 3	5,0±0,01***	1,9±0,01	3,3±0,07***	6,9±0,01***	1,7±0,02	3,9±0,04***
	bcl 2	—	3,1±0,03	1,9±0,01***	—	3,3±0,01	0,7±0,01***
	Ki 67	—	2,7±0,04	1,7±0,01***	—	3,9±0,03	1,1±0,01***
фибробласты	P53	4,9±0,01***	2,4±0,03	3,1±0,06***	4,7±0,02***	1,6±0,01	2,9±0,08***
	Caspasa 3	6,2±0,03***	3,3±0,02	5,2±0,08***	7,0±0,02***	2,9 ±0,01	4,8±0,09***
	bcl 2	—	3,9±0,04	1,6±0,01***	—	4,4±0,06	2,5±0,01***
	Ki 67	—	3,5±0,01	1,9±0,02***	—	4,0±0,03	2,4±0,09***

Примечание: \*\*\* –  $p \leq 0,001$  степень статистической достоверности различий показателей по сравнению с таковыми основной группы (милиацил).

У животных основной группы, инфицированных золотистым стафилококком без антилактоферриновой активности на 3 сутки также уменьшалось количество p53 положительных эпителиоцитов в сравнении с таковым показателем у животных первой и второй контрольных групп соответственно в 1,5 раза и в 1,4 раза. Данный показатель на 7 сутки соответственно был меньше в основной группе по сравнению, чем у животных контрольных групп в 1,1 и 1,2 раза. Уменьшалось количество p53 положительных фибробластов у животных основной группы по сравнению с животными первой и второй контрольных групп в 1,6 раза и в 1,4 раза. Этот показатель на 7 сутки был также меньше у крыс основной группы по сравнению с контрольными группами соответственно в 1,3 и 2,1 раза.

В этой связи полученные нами данные по активизации экспрессии гена bcl-2 в клетках на поле воспаления при лечебном воздействием милиацила (в том числе при введении персистентного штамма стафилококка АЛФА<sup>+</sup>) о

том, что данный протеин может рассматриваться как внутриклеточный супрессор апоптоза, способствующий выживаемости эпителиоцитов, эндотелиоцитов и клеток фибробластического ряда на поле воспаления. Данная трактовка нам представляется вполне обоснованной, так ранее проведенными исследованиями (Нузов Б.Г., 1990; Нузов Б.Г. с соавт., 2012) было показано мембранопротекторное действие милиацила на клеточные структуры, что по своей сути предупреждает апоптозный процесс.

Изучение экспрессии каспазы 3 в наших исследованиях позволило получить дополнительный фактический материал, свидетельствующий об усугублении процессов повреждения мягких тканей под воздействием стафилококка, обладающего антилактоферриновой активностью (АЛФА<sup>+</sup>).

Идентификация цистеиновой протеазы (caspase 3) является более доказательным способом оценки апоптоза, свидетельствующим об его активации. Нами были получены следующие результаты.

На 3 сутки лечения милиацилом крыс, инфицированных золотистым стафилококком с антилактоферриновой активностью уменьшалось количество caspase3 положительных эпителиоцитов в сравнении с таковым показателем у животных первой и второй контрольных групп в 2,6 раза и в 1,7 раза. Данный показатель на 7 сутки соответственно был меньше в основной группе по сравнению, чем у животных контрольных групп в 4 и 2,3 раза. Уменьшалось количество caspase3 положительных фибробластов у крыс основной группы в сравнении с животными первой и второй контрольных групп в 1,9 раза и в 1,6 раза. Этот показатель на 7 сутки был также меньше у крыс основной группы по сравнению с аналогичным показателем контрольных групп соответственно в 2,4 и 1,7 раза.

У животных, инфицированных золотистым стафилококком без антилактоферриновой активности на 3 сутки лечения милиацилом также уменьшалось количество caspase 3 положительных эпителиоцитов в сравнении с таковым показателем у животных первой и второй контрольных групп в 1,8 раза и в 1,3 раза. Данный показатель на 7 сутки соответственно

был меньше в основной группе по сравнению, чем у животных контрольных групп в 1,9 и 1,6 раза. Уменьшалось количество caspasa 3 положительных фибробластов у крыс основной группы по сравнению с данным показателем первой и второй контрольных групп в 1,7 раза и в 1,6 раза. Этот показатель на 7 сутки был также меньше у крыс основной группы по сравнению с контрольными группами соответственно в 1,2 и 1,6 раза. Эти данные свидетельствуют о том, что миллиацил вполне вероятно тормозит провоцирование протеолитического прессинга апоптоза.

Милиацил ингибирует протеолитический процесс в клетках на поле воспаления. Однако для уточнения механизмов данного явления необходимы дополнительные биохимические исследования функций эффекторных каспаз, участвующих в диссоциации регуляторных ультраструктур, регулирующих репарацию ДНК, РНК и ДНК-репликации.

На 3 сутки лечения крыс основной группы, инфицированных золотистым стафилококком с антилактоферриновой активностью увеличивалось количество Ki-6 положительных эпителиоцитов по сравнению с аналогичным показателем второй контрольной группы в 1,6 раза, на 7 сутки данный показатель соответственно был выше в основной группе по сравнению, чем у животных второй контрольных группы в 3,5 раза. Увеличивалось количество Ki-67 положительных фибробластов у крыс основной группы по сравнению с аналогичным показателем второй контрольной группы в 1,8 раза, этот показатель на 7 сутки был также больше у крыс основной группы по сравнению с второй контрольной группы соответственно в 1,7 раза. У крыс которым лечение не проводилось Ki-67 положительные эпителиоциты, фибробласты обнаружены не были на 3 и 7 сутки.

У животных основной группы, инфицированных золотистым стафилококком без антилактоферриновой активности на 3 сутки лечения также увеличивалось количество Ki-67 положительных эпителиоцитов в сравнении с таковым показателем у животных второй контрольной группы в



3,2 раза, данный показатель на 7 сутки соответственно был больше в основной группе по сравнению, чем у животных второй контрольной группы в 2,2 раза. Также увеличивалось количество Ki-67 положительных фибробластов у крыс основной группы в 1,3 раза, чем у животных второй контрольной группы, этот показатель на 7 сутки был также больше у крыс основной группы по сравнению данным показателем у животных второй контрольной группы соответственно в 1,4 раза. У крыс которым лечение не проводилось Ki-67 положительные эпителиоциты, фибробласты обнаружены не были на 3 и 7 сутки.

В этой связи полагаем, что фракция пролиферации, устанавливаемая по маркировке Ki-67, определяющим вступление клеток в митотическую фазу клеточного цикла, может иметь существенное прогностическое значение и будет полезна в диагностическом плане при оценке процессов репарации гнойно-некротических дефектов мягких тканей.

Таким образом, милиацил стимулирует пролиферативную активность клеток раневой области и приводит к лимитированию апоптотической доминанты (противоапоптозное действие). При этом при применении 1 % раствора диоксида и облепихового масла, проведенными исследованиями обнаружено, что пролиферативная активность клеток была существенно снижена на фоне интенсивной экспрессии генов p53, каспазы 3 и подавления экспрессии генов bcl-2, Ki 67.

Таким образом, разработанный способ прогнозирования течения гнойно-воспалительных процессов мягких тканей на основе иммуноцитохимической идентификации экспрессии проапоптотических белков p53, caspase-3, антиапоптотического белка bcl-2, а также белка Ki-67 открывает новые перспективы в хирургической практике.

### Финансовая модель

№ п/п	наименование статьи	единица - (чел., мес., шт. и т.п.)	кол-во	цена (руб.)	Стоимость (руб.)
1	Закупка иммуноцитохимических наборов реактивов.	8 наборов	240 реактивов	30 000	240 000
2	Зарплата лаборантам	1	2 лаборанта	15 000	30 000
ИТОГО				240 000	

Данная финансовая модель рассчитана на использования разработанного способа при исследовании 60 больных.

### Конкурентные преимущества проекта

1. В работе используются данные экспериментальных исследований.
2. Разработанный способ прогнозирования течения гнойно-воспалительных процессов позволяет наиболее точно и объективно оценить течение гнойно-воспалительных процессов.
3. Данный проект не имеет аналогов на рыночном пространстве, так как является объективным методом оценки основанных на лабораторных данных.
4. Данный способ можно использовать при лечении больных.
5. Данный способ можно использовать в фармацевтическом производстве для оценки эффективности создаваемых лекарственных препаратов.

### Инновационность

Впервые проведена на экспериментальном материале иммуноцитохимическая идентификация экспрессии проапоптотических белков p53, caspasa 3 и экспрессии антиапоптотических белков bcl-2, ki-67

для установления характера течения и прогнозирования репаративных процессов в гнойных ранах.

### **Информация о профильных публикациях, грантах и соискателях**

1. Магомедов А.Р., Стадников А.А., Нузова О.Б., Прудников А.В. Новый способ лечения гнойных ран // Бюллетень восточно-сибирского научного центра. - 2012. - №4 часть1. - С. 205-209.
2. Прудников А.В., Стадников А.А., Нузова О.Б., Магомедов А.Р. Клиническая и морфофункциональная характеристика репарации гнойных ран при использовании милиацила // Бюллетень восточно-сибирского научного центра. - 2012. - №4 часть2. - С. 190-192.
3. Прудников А. В., Стадников А. А., Нузова О. Б. Оценка течения раневого процесса у крыс при различных способах местного лечения гнойных ран в аспекте нейроэндокринной регуляции // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2012. – Т. 1, № 4. - С. 44-48.
4. Прудников А.В., Карташова О.Л., Уткина Т.М. Характеристика репарации гнойных ран при различных способах местного лечения // Материалы VII международной научной конференции молодых ученых-медиков. - Курск. - 2012. - С. 44-48.
5. Прудников А.В. Применение милиацила для лечения гнойных ран // Журнал российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И.Пирогова. - Материалы VIII Международной (XVII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. - Москва. - 21 марта 2013г. - С. 348.
6. Нузова О.Б., Прудников А.В., Магомедов А.Р. Эффективность использования милиацила при лечении гнойных ран // Ежегодная областная молодежная научно-практическая конференция. Материалы конференции. - Оренбург. - 2012. - С.
7. Прудников А.В. Изменения в нейроэндокринной системе крыс при различных способах лечения ран // Сборник материалов «II Всероссийской конференции с международным участием студентов и молодых ученых в рамках «дней молодежной медицинской науки»,

посвященной 125-летию со дня рождения чл.-корр. амн сср профессора Ф.М. Лазаренко». - Оренбург. - 2012. - С. 203-204.

8. Прудников А.В. Регенерационный гистогенез гнойных ран под влиянием различных способов местного лечения // Сборник научных работ II международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых "Пироговские чтения". - г.Челябинск.- 2012г. - С. 198-200.

9. Прудников А.В., Стадников А.А., Нузова О.Б., Карташова О.Л., Магомедов А.Р. Характеристика репарации тканей гнойных ран на основе иммуноцитохимической идентификации экспрессии синтеза про- и антиапоптотических генов // Морфологические ведомости. - №3. - 2013. - С. 89-91

10. Нузова О. Б., Стадников А. А., Прудников А. В. Сравнительное исследование влияния различных методов лечения на заживление гнойных ран // Альманах молодой науки. - Оренбург. - № 1. - 2013. - С. 17-20.