

На правах рукописи

ТАРКОВА Александра Романовна

**Местное гемостатическое ванкомицин-содержащее средство
для лечения и профилактики осложнений срединной стернотомии
(экспериментальное исследование)**

14.01.26 - Сердечно-сосудистая хирургия

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Подпись
соискателя

Новосибирск – 2017

Работа выполнена в Центре хирургии аорты, коронарных и периферических артерий ФГБУ «Сибирский федеральный биомедицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» МЗ РФ

Научный руководитель

д-р медицинских наук, профессор,
ЧЕРНЯВСКИЙ Александр Михайлович

Официальные оппоненты:

КОЗЛОВ Борис Николаевич, доктор медицинских наук
(Кардиохирургическое отделение №1
ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук», 634012, Томск, ул. Киевская, дом 111 а.; заведующий
кардиохирургическим отделением №1; ведущий научный сотрудник отделения
сердечно-сосудистой хирургии)

ШИХВЕРДИЕВ Назим Низамович, доктор медицинских наук, профессор
(1-ая кафедра хирургии (усовершенствования врачей) Федеральное государственное
бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-
медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской
Федерации, 194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д.6 доцент 1-ой
кафедры хирургии (усовершенствования врачей))

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное учреждение
«Институт хирургии имени А.В. Вишневского» Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(117997, Москва, Большая Серпуховская, 27)

Защита состоится 13.09.2017 года в 14 часов на заседании диссертационного совета
Д 208.063.01 при ФГБУ «СФБМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России.
Адрес: 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15;
e-mail: Lenko@meshalkin.ru
http://meshalkin.ru/nauchnaya_deyatelnost/dissertatsionnyy_sovet/soiskateli

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
ФГБУ «СФБМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России
и на сайте http://meshalkin.ru/nauchnaya_deyatelnost/dissertatsionnyy_sovet/soiskateli

Автореферат разослан .08.2017 года

Ученый секретарь совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций
д-р мед. наук, профессор

Ленько Евгений Владимирович

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ОЦ-В – местное гемостатическое ванкомицин-содержащее средство на основе окисленной целлюлозы

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Кровотечение из губчатого вещества грудины и стернальная инфекция – актуальные проблемы современной кардиохирургии [Kjaergard H.K. et al., 2014]. По данным мировой литературы послеоперационное кровотечение достоверно увеличивает 30-дневную летальность и значительно ухудшает течение послеоперационного периода [Christensen M.C. et al., 2012]. В большинстве мировых кардиохирургических центров для остановки кровотечения используют костный воск, широкое применение которого обусловлено эффективностью действия, низкой стоимостью и отсутствием альтернативных гемостатических средств [Vestergaard R.F. et al., 2015]. Однако по данным многочисленных морфологических исследований, он ингибирует регенерацию костной ткани, ухудшает заживление грудины и способствует возникновению стернальной инфекции [Wellisz T. et al., 2008; Cimochowski G. E. et al., 2001]. В связи с этим, в хирургической практике используют местные гемостатические средства. Но, несмотря на их большое разнообразие, универсальных гемостатиков нет.

Частота встречаемости стернальной инфекции в кардиохирургии достигает 6% [Magedanz E.H. et al., 2010]. В подавляющем большинстве возбудителями стернальной инфекции являются грамположительные бактерии [Rehman S.M. et al., 2014]. Согласно рекомендациям по применению антибактериальных препаратов, грамположительная микрофлора в 100% случаев является чувствительной к ванкомицину [Rehm S.J. et al., 2012].

Совместно с ФГБУН «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова» СО РАН получен комплекс – местное гемостатическое ванкомицин-содержащее средство на основе окисленной целлюлозы (ОЦ-В).

Экспериментальное исследование эффективности комплекса ОЦ-В позволит оценить новое отечественное гемостатическое средство с антибактериальным действием для лечения и профилактики осложнений срединной стернотомии в кардиохирургии.

Гипотеза

Применение ОЦ-В эффективно снижает объем кровопотери из губчатого вещества грудины после срединной стернотомии и профилактирует развитие раневых инфекционно-воспалительных осложнений в послеоперационном периоде

Цель исследования

Дать экспериментальную оценку эффективности ОЦ-В

Задачи исследования

1. Провести сравнительную оценку гемостатической эффективности ОЦ-В и костного воска в условиях кровотечения из губчатого вещества грудины после срединной стернотомии в эксперименте
2. Оценить частоту встречаемости локального воспаления грудины при использовании ОЦ-В и костного воска после срединной стернотомии
3. Сравнить антибактериальную активность ОЦ-В и аптечного ванкомицина в условиях *in vitro*
4. Оценить регенерацию костной ткани после остеосинтеза грудины при использовании костного воска и ОЦ-В при выполнении срединной стернотомии в эксперименте

Новизна исследования

- Разработано новое местное гемостатическое ванкомицин-содержащее средство на основе окисленной целлюлозы, сходное по проявленной специфической фармакологической активности с аптечным ванкомицином
- Установлено, что в условиях полной гепаринизации (АСТ>500) применение материала ОЦ-В позволяет достоверно снизить объем

кровопотери из губчатого вещества грудины лабораторного животного в сравнении с костным воском

- Использование материала ОЦ-В для остановки кровотечения из губчатого вещества грудины не вызывает локального воспаления грудины и не оказывает отрицательного влияния на регенерацию костной ткани после срединной стернотомии

Отличие полученных новых научных результатов от результатов, опубликованных другими авторами

Впервые разработано местное гемостатическое ванкомицин-содержащее средство на основе окисленной целлюлозы, оценены его кровоостанавливающие, антибактериальные свойства, влияние на регенерацию костной ткани грудины.

Достоверность выводов и рекомендаций

Использование признанных методик разработки дизайнов проведения клинических экспериментов, применение научного анализа с помощью методов статистической обработки являются свидетельством достоверности результатов и выводов.

Практическая ценность работы

Результаты настоящего исследования демонстрируют эффективность действия ОЦ-В и возможности его использования в качестве альтернативного способа местного гемостаза и профилактики раневых инфекционно-воспалительных осложнений в кардиохирургии.

Краткая характеристика клинического материала и научных методов исследования

В основе диссертационной работы лежат результаты пилотного исследования на 20 лабораторных животных (мини свиньи), которым после

срединной стернотомии в условиях полной гепаринизации на губчатое вещество грудины наносили костный воск (n=10) или ОЦ-В (n=10) и накладывали марлевые салфетки. По прошествии 60 минут оценивали объем интраоперационной кровопотери путем взвешивания салфеток на настольных весах. В течение трех недель после операции оценивали клинические признаки воспаления, далее выполняли забор грудины для гистологического исследования. Все статистические расчёты проводились в программе Rstudio. Сравнительный анализ проводился непараметрическими методами. Проверка статистических гипотез проводилась при критическом уровне значимости $p=0,05$.

Использованная аппаратура

- Весы электронные лабораторные ВР610 («Сартогосм», Россия)
- Коагулометр портативный «Наемochron response» («Accriva diagnostics», США)
- Микроскоп «Axioscop 40» с фотокамерой «AxioCam MRc5» («Carl Zeiss», Германия)

Личный вклад автора

Автором лично выполнены все операции по исследованию эффективности действия ОЦ-В и забору экспериментальных образцов грудины для гистологического исследования. Автор является одним из соавторов полученного патента на изобретение. Автором был проведен статистический анализ результатов эксперимента и интерпретированы полученные данные.

Реализация и внедрение результатов работы

Основные положения и результаты диссертационной работы используются в экспериментальной деятельности Лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии ФГБУ «СФБМИЦ им. ак.

Е.Н. Мешалкина» Минздрава России. Применение в практике результатов диссертации способствует уменьшению объема интраоперационной кровопотери в условиях полной гепаринизации и снижению инфекционных осложнений в послеоперационном периоде.

Апробация работы и публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 6 статей в изданиях, рекомендованных ВАК; 6 тезисов; 1 патент. Основные положения работы доложены и обсуждены на российских и зарубежных конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 101 странице машинописного текста и состоит из введения; четырех глав, содержащих литературный обзор, описание используемых материала и методов исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов; ограничения исследования, выводы, список используемой литературы. Указатель литературы содержит 18 отечественных и 141 зарубежный источник. Работа иллюстрирована 15 таблицами и 16 рисунками.

Основные положения, выносимые на защиту

- В условиях полной гепаринизации (АСТ>500) применение материала ОЦ-В позволяет снизить объем кровопотери из губчатого вещества грудины лабораторного животного в сравнении с костным воском
- Использование материала ОЦ-В для остановки кровотечения из губчатого вещества грудины не вызывает локального воспаления и не оказывает отрицательного влияния на регенерацию костной ткани
- Антимикробное действие ОЦ-В сходно по проявленной специфической фармакологической активности с аптечным ванкомицином

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Это пилотное экспериментальное исследование по изучению эффективности действия нового местного гемостатического ванкомицин-содержащего средства на основе окисленной целлюлозы в сравнении с костным воском для остановки кровотечения из губчатого вещества грудины и профилактики локального воспаления грудины в послеоперационном периоде на основании объема интраоперационной кровопотери из губчатого вещества грудины при срединной стернотомии и гистологического исследования срезов грудины.

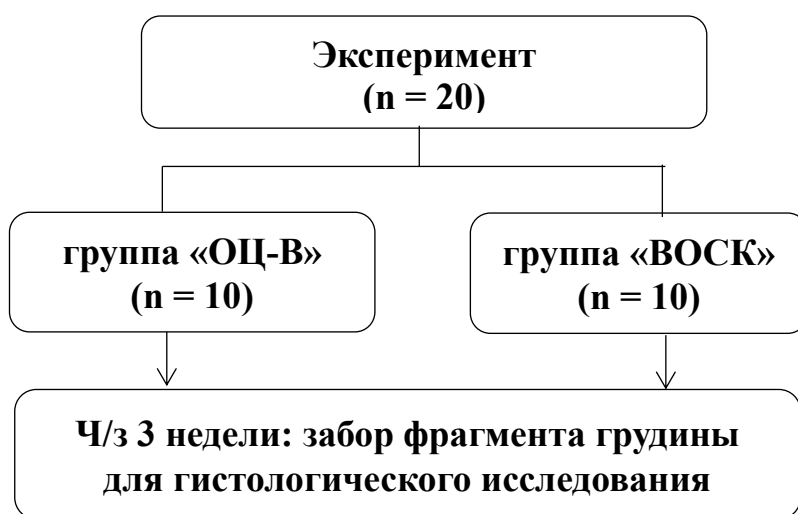


Рисунок 1. Дизайн исследования

Лабораторным животным после выполнения срединной стернотомии на губчатое вещество грудины наносился 1 грамм гемостатического материала в зависимости от группы.

Конечные точки:

- Первичная конечная точка:
 - Объем интраоперационной кровопотери (мл) в течение 1 часа
- Вторичные конечные точки:
 - Клинические признаки воспаления (отек, гиперемия, гнойное отделяемое из послеоперационной раны)
 - Гистологические признаки воспаления (выраженность воспалительной инфильтрации: слабая, выраженная)

- Степень формирования костных балок (слабая, умеренная, выраженная)
- Количество сосудов в межбалочном пространстве (малое, умеренное, большое)
- Количество фибробластов (малое, умеренное, большое)
- Антимикробное действие в условиях *in vitro* в сравнении с аптечным ванкомицином

Эксперимент проводился в условиях Лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии ФГБУ «Сибирский федеральный биомедицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России. В качестве хирургической модели были выбраны мини-свиньи обоего пола в количестве 20 штук. Средний возраст животных составил 6 месяцев.

Экспериментальную работу осуществляли согласно этическим нормам, регламентирующим эксперименты на животных, в условиях специализированной ветеринарной операционной под наркозом, с соблюдением правил асептики и антисептики.

Таблица 1

Демографические характеристики животных по группам.
Количественные признаки представлены как среднее (стандартное отклонение) и медиана (25; 75 перцентиль)

Признак	Группа «ВОСК» (n=10)	Группа «ОЦ-В» (n=10)	p, уровень
Вес животного (кг)	43 (± 10)	45 (± 10)	>0,99
Площадь продольного среза грудины (см ²)	10,2 [8,0; 17,4]	12,8 [3,6; 15,2]	0,43

Таблица 2

Показатели АСТ до и после операции.
Данные представлены как среднее (стандартное отклонение) и медиана (25; 75 перцентиль)

Показатель	Группа «ВОСК» (n=10)	Группа «ОЦ-В» (n=10)	p, уровень
АСТ до операции (сек)	1500 [1383; 1500]	1500 [1421; 1500]	>0,99
АСТ после операции (сек)	131 (± 34)	139 (± 37)	>0,99

Группы были сопоставимы по указанным признакам. Полученные данные были подтверждены статистически (табл. 1, табл. 2).

Для оценки антибактериальной активности использовали аптечный ванкомицин и грамположительные микроорганизмы из состава «Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»» Роспотребнадзора.

Анализ объема интраоперационной кровопотери

При сравнении объема интраоперационной кровопотери в течение 1 часа обнаружено, что медиана объема кровопотери в группе «ВОСК» составила 12,79 [12,36; 13,68] мл, а в группе «ОЦ-В» – 6,95 [1,57; 8,1] мл ($p < 0,001$).

Анализ локального воспаления

В течение трех недель после операции клинических признаков воспаления ни в одной из групп обнаружено не было. У всех лабораторных животных обеих групп отмечалось заживление послеоперационного шва первичным натяжением. Отека, гиперемии и гнойного отделяемого из послеоперационной раны не наблюдалось.

При гистологическом исследовании срезов грудины через 3 недели после операции обнаружено, что выраженная воспалительная инфильтрация чаще встречалась в группе «ВОСК», чем в группе «ОЦ-В» ($p = 0,02$). Различия в группах являются статистически значимыми согласно точному критерию Фишера.

Анализ антибактериальной активности ОЦ-В и аптечного ванкомицина в условиях *in vitro*

Результаты испытания действия препаратов на патогенные бактерии *S. aureus*, *E. faecium* представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3

Определение чувствительности *S. aureus* и *E. faecium*
к исследуемым препаратам

Концентрация препарата, %	Штамм / препарат / КОЕ/мл			
	<i>S. aureus</i>		<i>E. faecium</i>	
	Ванкомицин	ОЦ-В	Ванкомицин	ОЦ-В
0%	$3,5 \times 10^9$	$3,5 \times 10^9$	$2,4 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$
25%	$1,0 \times 10^5$	$9,6 \times 10^4$	$1,0 \times 10^6$	$7,0 \times 10^5$
50%	$1,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$7,0 \times 10^5$	$9,0 \times 10^5$
100%	$9,0 \times 10^3$	$9,3 \times 10^3$	$7,3 \times 10^5$	$8,0 \times 10^5$

Уменьшение титра клеток при добавлении ванкомицина и ОЦ-В в случае *S. aureus* свидетельствует о чувствительности микроорганизма к исследуемым препаратам. В случае штамма *E. faecium* при добавлении исследуемых препаратов титр клеток снижался на 1-2 порядка. Полученные результаты соответствуют литературным данным о низком бактериостатическом действии ванкомицина относительно патогенных бактерий вида *E. faecium*.

Таблица 4

Диаметр зон подавления роста тест-штаммов *S. aureus* и *E. faecium*
в зависимости от концентрации добавляемых препаратов

Концентрация препарата, %	Штамм / препарат / диаметр зон подавления роста, мм*			
	<i>S. aureus</i>		<i>E. faecium</i>	
	Ванкомицин	ОЦ-В	Ванкомицин	ОЦ-В
25	22±5	20±4	15±1 сл	12±2 сл
50	26±6	24±3	15±2 сл	14±2 сл
100	26±2	24±2	18±1 сл	16±1 сл

Обозначения: сл – слабо выраженное угнетение роста культуры

*пограничное значение диаметра зоны подавления роста для *S. aureus* ≥ 15 мм

пограничное значение диаметра зоны подавления роста для *E. faecium* ≥ 17 мм

Штамм *E. faecium*, так же, как и в опыте при культивировании в жидкой питательной среде, наблюдалось бактериостатическое слабо выраженное действие обоих препаратов. В случае *S. aureus* действие обоих препаратов было литическим.

Результаты исследования действия препаратов на штаммы MRSE и MRSA представлены в таблицах 5 и 6.

Таблица 5

Титр тест-штаммов MRSE и MRSA при культивировании в жидкой среде в зависимости от концентрации добавляемых препаратов

Концентрация препарата, %	Штамм / препарат / КОЕ/мл			
	MRSE		MRSA	
	Ванкомицин	ОЦ-В	Ванкомицин	ОЦ-В
0	$3,3 \times 10^9$	$3,3 \times 10^9$	$4,6 \times 10^9$	$4,6 \times 10^9$
25	$1,5 \times 10^4$	$5,7 \times 10^4$	$9,3 \times 10^4$	$8,0 \times 10^4$
50	$3,3 \times 10^3$	$1,8 \times 10^4$	$3,7 \times 10^4$	$3,0 \times 10^5$
100	$2,6 \times 10^3$	$4,8 \times 10^3$	$2,1 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$

Таблица 6

Диаметр зон подавления роста тест-штаммов MRSE и MRSA в зависимости от концентрации добавляемых препаратов

Концентрация препарата, %	Штамм / препарат / диаметр зон подавления роста, мм*			
	MRSE		MRSA	
	Ванкомицин	ОЦ-В	Ванкомицин	ОЦ-В
5	21±3	22±3	20±3	20±2
10	25±4	25±4	23±2	22±3
25	28±3	27±4	25±4	23±2
50	30±3	28±5	25±4	27±2
100	32±5	32±3	26±3	27±3

Обозначения:

* пограничное значение диаметра зоны подавления роста для MRSE ≥ 15 мм
пограничное значение диаметра зоны подавления роста для MRSA ≥ 15 мм

В условиях данных опытов оба исследуемых препарата эффективно подавляли рост патогенных полирезистентных штаммов MRSE и MRSA сходным образом, проявляя четко выраженное литическое действие.

Результаты исследования действия препаратов на патогенные бактерии *S. pyogenes* и *S. pneumoniae* представлены в таблицах 7 и 8.

Таблица 7

Титр тест-штаммов *S. pyogenes* и *S. pneumoniae* при культивировании в жидкой среде в зависимости от концентрации добавляемых препаратов

Концентрация препарата, %	Штамм, препарат, КОЕ/мл			
	<i>S. pyogenes</i>		<i>S. pneumoniae</i>	
	Ванкомицин	ОЦ-В	Ванкомицин	ОЦ-В
0%	$2,7 \times 10^9$	$2,7 \times 10^9$	$3,0 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$
25%	$4,4 \times 10^4$	$9,6 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$
50%	$6,0 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$
100%	$8,7 \times 10^3$	$7,0 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$

Добавление и ОЦ-В и аптечного ванкомицина показало сходное значительное снижение численности жизнеспособных клеток.

Таблица 8

Диаметр зон подавления роста тест-штаммов *S. pyogenes* и *S. pneumoniae* в зависимости от концентрации добавляемых препаратов

Концентрация препарата, %	Штамм / препарат / диаметр зон подавления роста, мм*			
	<i>S. pyogenes</i>		<i>S. pneumoniae</i>	
	Ванкомицин	ОЦ-В	Ванкомицин	ОЦ-В
25	25±1	24±1	28±4	26±3
50	26±2	25±1	30±3	28±3
100	28±1	27±2	32±3	29±4

Обозначения:

*допустимый диапазон диаметра зон подавления роста для *S. pyogenes* ≥ 17 мм

допустимый диапазон диаметра зон подавления роста для *S. pneumoniae* ≥ 17 мм

Наиболее чувствительным к исследуемым препаратам был штамм *S. pneumoniae*. Штамм *S. pyogenes* проявил несколько меньшую, но сходную меж собой чувствительность к испытываемым препаратам.

Анализ регенерации костной ткани после остеосинтеза грудины

При сравнении двух групп установлено, что в группе «ОЦ-В» в большинстве случаев обнаружена выраженная степень формирования костных балок, а в группе «ВОСК» - слабая. Однако при составлении таблицы сопряженности статистически значимой разницы между группами получено не было ($p = 0,068$). При сравнении двух групп по количеству фибробластов и количеству сосудов в межбалочном пространстве статистически значимого различия получено не было ($p=0,395$ и $p=0,554$, соответственно).

ВЫВОДЫ

1. В условиях полной гепаринизации ($ACT > 500$) применение материала ОЦ-В позволяет достоверно снизить объем кровопотери из губчатого вещества грудины лабораторного животного по сравнению с костным воском
2. Использование материала ОЦ-В для остановки кровотечения из губчатого вещества грудины не вызывает локального воспаления грудины
3. Антимикробное действие ОЦ-В сходно по проявленной специфической фармакологической активности с аптечным ванкомицином
4. При гистологическом исследовании грудины обнаружено, что применение материала ОЦ-В на грудине в качестве гемостатического агента не оказывает отрицательного влияния на регенерацию костной ткани

ПУБЛИКАЦИИ

Всего опубликованных работ – 33, из них работ по теме диссертации – 13, среди них:

1. Работ, опубликованных в отечественных ведущих научных журналах и изданиях, определенных ВАК – 6
2. Монографий – 0
3. Работ в зарубежных научных изданиях – 6
4. Патентов – 1
5. Работ, опубликованных в материалах всероссийских и международных конференций и симпозиумов (тезисов) – 6
6. Публикаций в электронных научных изданиях и депонированных рукописей – 0

РАБОТЫ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в отечественных ведущих научных журналах и изданиях, определенных в действующем перечне ВАК:

1. Чернявский А.М., Григорьев И.А., Ткачева Н.И., Морозов С.В., Таркова А.Р. // Контроль локального гемостаза с помощью препаратов окисленной целлюлозы / **Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова.** – 2014. – № 8. – С. 71 – 75.
2. Таркова А.Р., Чернявский А.М., Григорьев И.А., Морозов С.В., Ткачева Н.И., Родионов В.И. // Гемостатический материал местного действия на основе окисленной целлюлозы / **Сибирский научный медицинский журнал.** – 2015. – №2. – С. 11 – 15.
3. Таркова А.Р., Чернявский А.М., Морозов С.В., Григорьев И.А., Родионов В.И., Кравченко Н.И. / Эффективность различных форм местных гемостатических материалов на основе окисленной целлюлозы в эксперименте / журнал «**Вестник хирургии им. И.И. Грекова.**» – 2015. – Т. 174. – №6. – С. 56 – 60.

4. Чернявский А.М., Таркова А.Р., Рузматов Т.М., Морозов С.В., Григорьев И.А. // Инфекции в кардиохирургии / **Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова.** – 2016. – №5. – С. 64 – 68.
5. Таркова А.Р., Морозов С.В., Ткачева Н.И., Григорьев И.А., Родионов В.И., Чернявский А.М. // Оценка гемостатических свойств нового местного антибиотик-содержащего средства на основе окисленной целлюлозы в эксперименте / **Сибирский научный медицинский журнал.** – 2016. – Т.36. – №6. – С. 12 – 17.
6. Таркова А.Р., Чернявский А.М., Морозов С.В., Григорьев И.А., Ткачева Н.И., Родионов В.И. // Оценка эффективности действия нового местного гемостатического ванкомицин-содержащего средства на основе окисленной целлюлозы в эксперименте / **Сибирский медицинский журнал.** – 2017. – Т.32. – №1. – С. 108 – 111.

Монографии

(отсутствуют)

Работы, опубликованные в зарубежных научных изданиях:

(отсутствуют)

Патенты, свидетельства, дипломы:

Работа получила поддержку гранта Российского Фонда Фундаментальных исследований (РФФИ) конкурса инициативных проектов, выполняемых молодыми учеными («Мой первый грант») (договор № 16 16-34-00895\16 от 03.02.2016 г.).

Получен патент № 2563279 от 21.08.2015 «Способ получения гемостатического средства на основе окисленной целлюлозы с использованием микроволнового воздействия (варианты)».

Соискатель

Таркова А.Р.