

*Г.Г. Прохоров, Т.Ю. Галунова, З.А. Раджабова, А.С. Мадагов, М.А. Котов,
Р.А. Нажмудинов, Д.А. Ракитина, С.С. Артемьев*

Микрофлора инфильтративно-язвенной формы базальноклеточного рака кожи на фоне криогенного лечения

ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова» Минздрава России

Микробиологические исследования материала, полученного от пациентов с инфицированными формами базальноклеточного рака кожи, выявили преобладание сапрофитных микроорганизмов. Высеваемые штаммы золотистого стафилококка, не вызывали явных клинических проявлений в виде острого раневого инфекционного процесса. Выполнение криодеструкции опухоли при температуре аппликатора до минус 185°C в трех циклах охлаждения с активным межцикловым оттаиванием во всех случаях приводило к формированию зоны крионекроза с сохранением прежней микрофлоры. Культуры штаммов золотистого стафилококка, выделенные от пациентов с базалиомами и подвергнутые трехкратному циклу криодеструкции, а также погружению в жидкий азот, выявили абсолютную резистентность исследованных штаммов к криогенным воздействиям. Вероятно, механизмы позитивных клинических результатов криодеструкции опухоли не связаны с каким-либо бактерицидным действием криогенной температуры на сопутствующую микрофлору.

Ключевые слова: криохирургия, криоабляция, базалиома, базальноклеточный рак кожи, микрофлора, раневая инфекция, криодеструкция, криорезистентность

Криогенные технологии остаются в числе современных способов девитализации злокачественных опухолей [1]. Среди пациентов со злокачественными поражениями кожи около 2/3 составляют случаи узелково- и инфильтративно-язвенной формы заболевания, что сопряжено с неизбежным микробным загрязнением опухолевой раны, развитием в ней воспалительных и инфекционных процессов [8]. Известны исследования и клинические наблюдения, показывающие эффективность криодеструкции при лечении инфицированных ран, острых и хронических гнойно-воспалительных заболеваний [3-7, 9-12], а также мнение, что криогенное воздействие обладает дезинфицирующим эффектом на обсемененные объекты [2]. Возможным следствием может стать неко-

торое пренебрежение правилами асептики при использовании криогенных технологий лечения. Однако, еще в начале прошлого века, как только инженеры получили сжиженные газы, микробиологи обнаружили устойчивость изолированных лабораторных культур микроорганизмов к крайне низкой температуре. В связи с широким применением криодеструкции вопрос о том, что происходит с микрофлорой инфицированных злокачественных опухолей в процессе лечения, имеет важное практическое значение. Участок последующего крионекроза при неблагоприятном течении послеоперационного периода может стать источником раневого инфекционного осложнения. Поэтому, необходимо знать, в какой степени общепринятые режимы криодеструкции открытых инфицированных форм опухолевых поражений могут оказывать влияние на сопутствующую микрофлору и иметь более ясные данные о степени чувствительности микроорганизмов, инвазирующих ткань злокачественной опухоли.

Целью исследования явилось изучение характера микрофлоры при инфильтративно-язвенной форме базальноклеточного рака кожи, ее изменения после выполнения криодеструкции опухолевого очага и оценка криорезистентности тех штаммов микроорганизмов, которые обычно сопутствуют воспалительному процессу в тканях опухоли.

Объект и методы исследования

Из общего числа 256 пациентов, проходивших лечение в хирургическом отделении опухолей головы и шеи, криохирургические методы использованы в 18% наблюдений. Показаниями к криодеструкции явились множественные и рецидивные поражения в области лица и свода черепа, возраст пациентки, выраженная сопутствующая патология, отказ от хирургического лечения. Применяли аппараты аппликационного типа «Крио-иней», «АКГЭ-01», «КРАСА», распылитель жидкого азота типа «РА-1», а также малоинвазивную криотерапевтическую систему («МКС») с инъекционными криозондами. Методика криодеструкции включала охлаждение опухоли до температуры на уровне видимых границ ниже минус 40°C с экспозицией в течение 5 минут, с последующим полным отогреванием опухоли и повторным охлаждением. Забор материала стерильным ватным тампоном с поверхности опухолевой язвы для идентификации микрофлоры и опре-

деления ее чувствительности к антибиотикам осуществляли при поступлении пациентов в стационар, затем на первые и седьмые сутки после процедуры криодеструкции. Полное микробиологическое исследование микрофлоры выполнено у 40 больных.

Первичный материал доставляли в лабораторию в транспортной среде Стюарта. Посев проводили на 5% кровяной агар на основе Колумбийского агара, среду Эндо, среду Сабуро, желточно-солевой агар, сахарный бульон, тиогликолевую среду. Посевы инкубировали при 37°C в течение 20 часов. Из каждого штамма в стерильном физиологическом растворе приготавливали взвесь микроорганизмов, соответствующую 0,5 МкФ. Идентификацию микроорганизмов и определение чувствительности к антибиотикам осуществляли на микробиологическом анализаторе Microscan 4 (SIEMENS, США).

Для определения криорезистентности изолированных микробных культур, в чашках Петри *In vitro*, к поверхности питательной среды, после коврового посева на ней исследуемого штамма, прикладывали аппликатор криодеструктора АКГЭ-01, повторяя стандартную процедуру криодеструкции с охлаждением зоны воздействия до минус 180°C, с экспозицией 5 минут, последующим пассивным оттаиванием в течение 5 минут и повторением всего цикла.

Во второй серии исследования, моделируя режим открытого струйного орошения опухоли жидким азотом, покрытую микроорганизмами поверхность агара в чашках Петри заливали жидким азотом, соблюдая те же параметры по экспозиции и повторению циклов замораживания и оттаивания.

В третьей контрольной серии лабораторных исследований, для исключения негативного действия замораживания на культивационные свойства самой питательной среды, криогенному воздействию подвергали стерильные готовые среды, после чего производили на них посев микроорганизмов.

Все чашки Петри, обработанные разными способами, инкубировали при 37°C на протяжении 20 часов.

Результаты

Все пациенты благополучно переносили процедуру криодеструкции, которую выполняли им, как правило, в день поступления, как под проводниковой анестезией, так и под наркозом. Общее состояние пациентов оставалось удовлетворительным. В первые сутки после операции в зоне криовоздействия формировался отек мягких тканей, который усиливался в течение последующих двух суток и разрешался через 7-9 суток после криодеструкции. Зона демаркации крионекроза обозначалась на вторые сутки и в целом соответствовала зоне оледенения. Развитие раневой инфекции не зарегистрировано ни в одном случае, активную некрэктомию пациентам не выполняли. С первых и до седьмых суток после операции все больные получали антибактериальную терапию из группы цефалоспоринов или синтетических пенициллинов. В течение первых четырех суток отмечали активную лимфорею с поверхности крионекроза. Перевязки выполняли ежедневно с использованием 10% линимента синтомицина, левомеколя или присыпок банеоцина.

Во всех случаях был достигнут положительный эффект: частота рецидивов в течение двухлетнего наблюдения не превысила 0,6%. Отторжение некротического струпа происходило в сроки от одного до тех месяцев – в зависимости от объема и глубины опухолевой инвазии. Поверхности кожи эпителизировались с заполнением зоны дефекта депигментированным кожным регенератом в виде мягкого эластического рубца.

Микробиологические исследования клинического материала выявили преобладание микроорганизмов рода *Staphylococcus* (95%), причем доля *S.aureus* составила 49%, в том числе 4% штаммов устойчивых к оксациллину, *S.epidermidis* – 45%, *S.hominis* – 6%, в том числе 2% штаммов устойчивых к оксациллину. Следует отметить, что устойчивость к оксациллину этой группы микроорганизмов, как правило, сопряжена с множественной лекарственной устойчивостью, что создает существенные проблемы для антибактериальной терапии. Штаммы *E.coli* и *K.pneumoniae* выделялись в 5% случаев.

Различные схемы криовоздействия на выделенные штаммы стафилококков не оказали влияния на их рост, морфологические и биохимические свойства. Однако, обратило на себя внимание, что у госпитальных штаммов *S.epidermidis* увеличилась минимальная ингибирующая концентрация к некоторым антибактериальным препаратам: ципрофлоксацин с 4 мкг/мл до 8 мкг/мл, тетрациклин с 8 мкг/мл до 16 мкг/мл. То есть после криогенного воздействия в микробной ассоциации стали преобладать штаммы с более высокой резистентностью к антибиотикам.

Эксперименты по влиянию экстремально низких температур на бактерии были продолжены на микроорганизмах из рабочей коллекции: *E.coli* (ATCC 25922), *S.aureus* (ATCC 25923), *P.aeruginosa* (ATCC 27853) и госпитальных штаммах, выделенных от пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии: *E.faecium* (VRE), *S.maltophilia* (мультирезистентный), *K.pneumoniae* (ESBL), *P.aeruginosa* (MBL), *A.baumannii* (панрезистентный), *S.haemolyticus* (MR). После трехкратной криогенной обработки рост микроорганизмов в чашках Петри по окончании инкубации сохранялся во всех случаях. Растущие колонии равномерно распределялись по поверхности, включая зону криоаппликации, внешний вид и плотность колоний на чашках, ранее погруженных в среду жидкого азота, также не отличались от обычного (рис. 1).

Трехкратное криогенное воздействие на используемые питательные среды также не оказало влияния на последующий рост микроорганизмов.

Обсуждение

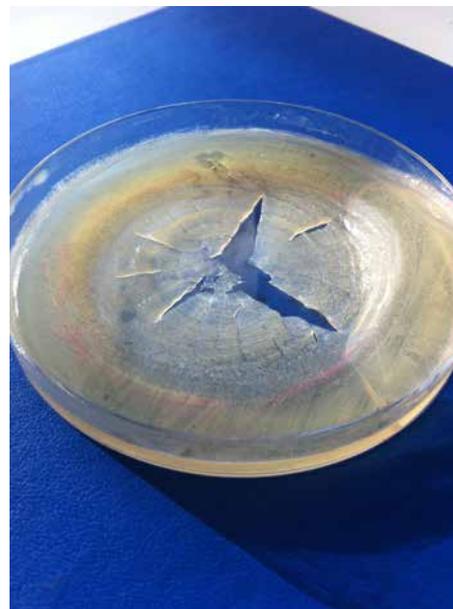
Сопоставление клинических наблюдений с результатами микробиологических исследований показывает внешнее несоответствие между клинически эффективным подавлением воспалительных явлений в зоне криодеструкции и отсутствием какой-либо способности крайне

ассоциации, и инфекционный процесс, сохраняя свою прежнюю активность в зоне крионекроза, оказывается изолированным от внутренней среды больного.

Вероятной причиной появления в посевах после криодеструкции стафилококков могло стать проведение в послеоперационном периоде антибактериальной терапии, в результате которой



а)



б)

Рис.1. Методика криогенного воздействия и ее результат: а) – процесс аппликационного охлаждения питательной среды после посева на нее культуры *S.aurens*; б) - рост колоний по всей поверхности чашки Петри после криодеструкции и последующей инкубации

низких температур подавлять активность микроорганизмов. Ситуация кажется тем более неясной, если учесть, что некротические ткани в зоне криодеструкции становятся питательной средой для микроорганизмов и потенциальным источником активизации инфекционного процесса в ране. Между тем есть два очевидных фактора, которые могут дать объяснение описанному явлению.

Криодеструкция уже в первые сутки после процедуры приводит к тромбозу кровеносных сосудов и ишемическому некрозу тканей в зоне их криоповреждения. Прекращение микроциркуляции и тканевого кровотока приводит к секвестрации некроза, блокирует резорбцию микробных токсинов, что проявляется улучшением общего состояния пациентов. Далее, в течение первой недели развивается значительный отек мягких тканей, прилежащих к зоне крионекроза, и обильная лимфоррея со стороны сохранившихся тканей, что также исключает резорбцию токсинов, тканевого детрита и продуктов аутолиза опухолевых клеток. В результате происходит разобщение между сохранившимися вокруг зоны криодеструкции здоровыми тканями и зоной активной жизнедеятельности микробной

оказывалась подавленной микрофлора, чувствительная к антибиотикам, и активный рост демонстрировали оставшиеся в ране антибиотикорезистентные штаммы.

Универсальная жизнестойкость микроорганизмов требует сохранения требований о необходимости соблюдения правил асептики и антисептики, не полагаясь на возможность мнимого бактерицидного действия криогенного уровня температуры во время выполнения криодеструкции. Более того, назначение антибактериальной терапии в послеоперационном периоде во всех случаях криодеструкции изначально инфицированной опухоли всегда будет оправдано. При этом, необходимо перед началом антибиотикотерапии проводить микробиологическое исследование с определением вида возбудителя и его антибиотикограммы.

Выводы

1. При инфицированных язвенных формах базальноклеточного рака кожи в составе микрофлоры преобладают низко вирулентные сапрофитные микроорганизмы и золотистый стафилококк.

2. Криодеструкция опухоли не оказывает влияния на микрофлору послеоперационной раны, микроорганизмы в зоне крионекроза сохраняют свою активность.
3. Механизмы позитивного криодоздействия при инфицированных язвенных формах базальноклеточного рака кожи не связаны с каким-либо бактерицидным действием криогенной температуры на сопутствующую микрофлору.
4. Появление после криодеструкции в посевах из зоны крионекроза госпитальных штаммов стафилококка, может иметь негативные клинические последствия и требует проведения целенаправленной антибактериальной терапии.
13. Чернышук В.И., Иськив Б.Г., Киневский О.Ф. «Криолечение наружного уха» // Материалы 15-го Всемирного конгресса международного общества криохирургов. – СПб., 2009. – С. 80-81.
14. Ширчков А.А., Кузнецова Н.Л. Использование криохирургического метода в лечении больных с воспалительными заболеваниями мягких тканей челюстно-лицевой области // Материалы 15-го Всемирного конгресса Международного общества криохирургов. – СПб., 2009. – С. 131-132.
15. Debellò A., Sasso F., Mattiussi A., Rovedo S. Cryosurgery of rectum and anus advanced cancer // *Cryosurgery*. – 2000. – № 4. – P. 9-10.
16. Prokhorov G.G., Zhirnovoi V.M., Prokhorov D.G., Zharinov G.M. Cryosurgical treatment of pelvic tumors // *Cryosurgery*. – 2004. – № 9. – P. 20-24.
17. Salemi G.S. Cryosurgery in chronic tonsillitis // 15th World congress of International Society of Cryosurgery. – Saint-Petersburg, Russia, 2009. – P. 22.

ЛИТЕРАТУРА

5. Беляев А.М., Прохоров Г.Г. Криогенные технологии в онкологии // Вопросы онкологии. – 2015. – Т. 61. – № 3. – С. 317-322.
6. Будрик В.В. Физические основы криометодов в медицине. – М., 2007. – Московский государственный технический университет им. Н.Э.Баумана. – 134 с.
7. Дюмин О.В., Пухлик С.М., Манюта А.И., Тагунова И.К. Криохирургия в оториноларингологии // Журнал ушных, носовых и горловых болезней. – 2005. – № 3. – С. 34-37.
8. Козлов В.А., Козлов И.В., Марочкин А.Г. Применение криовоздействия в комплексном лечении рожистого воспаления // В кн.: Достижения криомедицины. – СПб., 2001. – С. 28-30.
9. Коченов В.И., Цыбусов С.Н., Буланов О.В. «Сочетание методов замораживания при криохирургическом лечении атером кожи» // Материалы 15-го Всемирного конгресса международного общества криохирургов. – СПб., 2009. – С. 89.
10. Мерзлякин Н.В., Комкова Т.Б. Криохирургия остроо деструктивного панкреатита // В кн.: Достижения криомедицины. – СПб., 2001. – С. 44-47.
11. Нацвлишвили В.И. Некоторые клинические и теоретические аспекты криохирургии в отоларингологии // Вестник отоларингологии. – 1977. – № 2. – С. 49-54.
12. Пачес А.И., Пустынский И.Н., Демидов Л.В. Опухоли головы и шеи. – М.: Практическая медицина, 2013. – 160 с.

Поступила в редакцию 16.12.2016 г.

*G.G. Prokhorov, T.Yu. Galunova, Z.A. Radzhabova,
A.S. Madagov, M.A. Kotov, R.A. Nazhmudinov,
D.A. Rakitina, S.S. Artemiev*

Microflora of infiltrative-ulcerative form of basal cell skin cancer against the background of cryogenic treatment

N.N. Petrov Research Institute of Oncology
St. Petersburg

Microbiological examinations of the material obtained from patients with infected forms of basal cell skin carcinoma revealed the predominance of saprophytic microorganisms. Performing cryoablation with the temperature up to minus 185 ° C in three cycles with active thawing in all cases resulted in the formation of cryonecrosis zone and retaining the same microorganisms. Culture *S. aureus* strains isolated from patients with basal cell skin carcinoma and exposed by triple-cycle of cryoablation as well as immersed in liquid nitrogen revealed the absolute resistance of strains to cryogenic effects. Therefore positive clinical results of cryoablation of tumor are not connected with any bactericidal effect of cryogenic temperatures on accompanying microflora.

Key words: cryosurgery, cryoablation, basalioma, basal cell skin carcinoma, microflora, wound infection, cryodestruction, cryoresistance