

ARTICOL DE CERCETARE

Rolul TLR4 în răspunsul imun non-specific în managementul antiseptic al infecției în combustii

Oleksandr Adamovych Nazarchuk^{1*}, Vasyl Ivanovych Nahaichuk^{2,3}, Halyna Hryhorivna Nazarchuk⁴

¹Catedra de microbiologie, Universitatea Națională de Medicină Memorială Pirogov, Vinița, Ucraina;

²Catedra de chirurgie generală, Universitatea Națională de Medicină Memorială Pirogov, Vinița, Ucraina;

³Centrul de Combustologie, Spitalul Clinic Regional Vinița, Ucraina;

⁴Catedra de oftalmologie, Universitatea Națională de Medicină Memorială Pirogov, Vinița, Ucraina.

Data primirii manuscrisului: 02.10.2017

Data acceptării spre publicare: 07.12.2017

Autor corespondent:

Oleksandr Adamovych Nazarchuk, dr. șt. med., lector superior
Catedra de microbiologie
Universitatea Națională de Medicină Memorială Pirogov
str. Pirogov, 56, Vinița, Ucraina, cod poștal 21018
e-mail: nazarchuk@vnmnu.edu.ua

Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

Dinamica nivelului TLR4 și a colonizării microbiene la pacienții cu arsuri profunde, în cadrul managementului complicațiilor infecțioase, prin utilizarea decametoxinului, antiseptic cu expunere prelungită, în plagă.

Ipoteza de cercetare

Aplicarea preparatelor antimicrobiene cu eliberare prelungită de decametoxin accelerează procesele de reparare a plăgii, reducând colonizarea microbială și perioada inflamatorie a plăgii, contribuind, indirect, la normalizarea nivelelor moleculelor de semnalizare TLR4.

Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Aplicarea preparatelor antimicrobiene cu eliberare prelungită de decametoxin accelerează procesele de reparare a plăgii, reducând colonizarea microbială (începând cu a treia zi) și durata inflamatorie a plăgii (câte a 14-a zi), contribuind, indirect, la normalizarea moleculelor de semnalizare TLR4 (zilele 14 și 21), comparativ cu utilizarea de povidon-iodonat ($p < 0,001$).

Rezumat

Introducere. Noile abordări ale intervențiilor chirurgicale precoce la pacienții traumatizați au ameliorat semnificativ supraviețuirea, însă complicațiile infecțioase postoperatorii

RESEARCH ARTICLE

The role of TLR4 in the non-specific immune response under antiseptic management of burn wound infection

Oleksandr Adamovych Nazarchuk^{1*}, Vasyl Ivanovych Nahaichuk^{2,3}, Halyna Hryhorivna Nazarchuk⁴

¹Department of microbiology, National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Vinnytsya, Ukraine;

²Department of general surgery, National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Vinnytsya, Ukraine;

³Burn Center, Vinnytsya Regional Clinical Hospital, Vinnytsya, Ukraine;

⁴Department of ophthalmology, National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Vinnytsya, Ukraine.

Manuscript received on: 02.10.2017

Accepted for publication on: 07.12.2017

Corresponding author:

Oleksandr Adamovych Nazarchuk, PhD, senior lecturer
Department of microbiology
National Pirogov Memorial Medical University
56, Pirogov str., Vinnytsya, Ukraine, postal index 21018;
e-mail: nazarchuk@vnmnu.edu.ua

What is not known yet, about the topic

The dynamics of TLR4 and microbial colonization levels in patients with deep burns under the management of infectious complications using the application of antiseptic decamethoxinum with prolonged delivery into the wound.

Research hypothesis

The application of antimicrobials with prolonged release of decamethoxinum accelerates the reparative processes in the wound, reducing the microbial colonization and inflammatory period in the wound, indirectly contributing about to normalization of signalling molecules TLR4.

Article's added novelty on this scientific topic

The application of antimicrobials with prolonged release of decamethoxinum accelerates the reparative processes in the wound, reducing the microbial colonization (since the 3rd day) and inflammatory period in the wound (the 14th day), indirectly contributing about to normalization of signalling molecules TLR4 (the 14th and 21st days), comparably to the use of povidone-iodine ($p < 0.001$).

Abstract

Introduction. New approaches of early surgery in patients with hard burn trauma significantly has developed their survival, but postoperative infection complications period remain rele-

rămân o problemă importantă. Scopul a fost evaluarea în dinamica a TLR4 și a gradului de colonizare microbiană la pacienții cu arsuri profunde, în cadrul managementului complicațiilor infecțioase, folosind utilizarea decametoxinului antiseptic cu eliberare prelungită în plagă.

Material și metode. Între anii 2011-2017, 78 de pacienți critic bolnavi, cu arsuri de gradul 2b – 3, au fost implicați în cercetare. Toți pacienții au fost tratați conform protocoalelor în vigoare de tratare a combustivilor (necrectomie chirurgicală precoce, plastie cu grefă de piele liberă proprie sau străină, terapie antimicrobiană topică și sistemică, medicație simptomatică). Pacienții au fost împărțiți în două grupuri: (1) lotul de control (n=33, vârstă medie 45,2±2,6 de ani), cu administrare topică de antiseptic povidon iodonat și pansamente uscate-umed; (2) lotul de studiu (n=45, vârsta medie 50,2±1,9 de ani), care a primit ca anticeptic decametoxin (DCM) și aplicații cu pansamente cu tifon, impregnat anterior cu compoziția antimicrobiană a DCM. Identificarea microbiologică a agenților patogeni ai complicațiilor infecțioase, provenite din plăgi și prelevarea de probe de sânge din venă pentru măsurarea nivelului receptorilor TLR4 din ser, au fost efectuate la zilele 3, 7, 14, 21 de tratament, conform metodelor standard. Analiza statistică: softul Statistica 6.0.

Rezultate. Cercetările microbiologice au arătat că, în medie, numărul de microorganisme din exudatul plăgilor a fost de 5,6-7,3 UFC/ml. În grupul de observație (suprafața arsă – 31-50%), numărul de microorganisme din plăgi a depășit un indice similar în grupul de comparație de 1,3 ori ($p<0,05$). Microflora din plăgi a fost predominant reprezentată de *A. baumannii*, izolat sau în asociere. Când s-au utilizat pansamente cu DCM, colonizarea microbiană în plăgile arse a scăzut semnificativ în a 14-a zi, în comparație cu grupul de control ($p<0,01$). În grupul de comparație, microorganismele au crescut în pofida terapiei antimicrobiene sistemice și locale, în zilele 14 și 21 de tratament. Microflora persistentă: *A. baumannii*, *P. aeruginosa*. În ziua a 3-a și a 7-a nu au existat diferențe semnificative în concentrația serică de TLR4 dintre grupul de studiu (de la 6,83±0,27 la 9,35±0,39 ng/ml) și grupul de comparație (de la 7,19±0,35 la 9,82±0,38 ng/ml; $p>0,05$). De la a 14-a zi, nivelului moleculelor de semnalizare TLR4 a scăzut la 7,18±0,24 ng/ml la pacienții tratați cu DCM ($p<0,001$). În grupul de comparație, concentrația de TLR4 a fost la ziua 7 de tratament de 10,59±0,41 ng/ml. La 21 zile, în grupul de observație s-a demonstrat o scădere a TLR4 (5,19±0,20 ng/ml, $p<0,001$) până la valori de referință (4,5-5,0 ng/ml).

Concluzii. Aplicarea preparatelor antimicrobiene cu eliberare prelungită de decametoxin, accelerează procesele de reparare a plăgii, reducând colonizarea microbiană începând cu ziua 3 de tratament și perioada inflamatorie în plagă către ziua 14, contribuind, indirect, la normalizarea nivelului serice a moleculelor de semnalizare TLR4 către zilele 14-21, comparativ cu utilizarea de povidon-iodonat ($p<0,001$).

Cuvinte cheie: antimicrobiene, antiseptice, arsuri, decametoxin, povidon-iodonat, receptori toll-like.

vant. The aim of the actual study was to evaluate the dynamics of TLR4 and microbial colonization levels in patients with deep burns under the management of infectious complications using the application of antiseptic decamethoxinum with prolonged delivery into the wound.

Material and methods. Between 2011-2017 years, 78 critically ill patients with 2nd b – 3rd degree burns were involved in the research. All patients were treated accordingly to protocols of the treatment of burn disease (early surgical necrectomy; xenodermograft or autodermograft plastics; topical and systemic antimicrobial therapy, symptomatic administrations). Patients were divided in two groups: (1) comparison patients (n=33; middle age 45.2±2.6 years) received topical management with antiseptic povidone-iodine and its wet-drying bandages during dressings; (2) observation study group (n=45; middle age 50,2±1,9 years) topically received antiseptic decamethoxinum (DCM) and applications with gauze dressings, previously impregnated with the antimicrobial composition of DCM. Microbiological identification of pathogens of infectious complications from wounds and blood sampling from the vein in order to measure the level of toll-like receptors 4 (TLR4) in the serum were both proceeded (3d, 7th, 14th, 21st days of treatment) accordingly to the standard methods. Statistical analysis was conducted by means of Statistica 6.0.

Results. Microbiological research showed, on average, the number of microorganisms in the wound exudate of the patients was 5.6-7.3 CFU/ml. In the observation group (burn area of 31-50%), the number of microorganisms in wounds exceeded such index in the comparison group in 1.3 times ($p<0.05$). Wound microflora was represented mainly by *A. baumannii* and its associations with others. When antimicrobial dressings with antimicrobial composition with DCM had been used, microbial colonization in burn wounds decreased significantly on the 14th day in comparison to the control group ($p<0.01$). In the comparison group, microorganisms were registered to increase despite systemic and local antimicrobial therapy on the 14th and 21st day. *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and their associations had been still found. On the 3d and 7th day there were no significant difference in serum TLR4 in main group (from 6,83±0,27 to 9,35±0,39 ng/ml) and comparison group (from 7.19±0.35 to 9.82±0.38 ng/ml; $p>0.05$). Since the 14th day, there was a decrease in the level of TLR4 signalling molecules to 7.18±0.24 ng/ml in patients treated with antimicrobial composition of DCM ($p<0.001$). In the comparison group, the concentration of TLR4 was maintained at the 7th day (10.59±0.41 ng/ml). At 21 days, in the observation group, a TLR4 decrease (5.19±0.20 ng/ml, $p<0.001$) and normalization was proved (4.5-5.0 ng/ml).

Conclusions. The application of antimicrobials with prolonged release of decamethoxinum accelerates the reparative processes in the wound, reducing the microbial colonization (since the 3rd day) and inflammatory period in the wound (the 14th day), indirectly contributing about to normalization of signalling molecules TLR4 (the 14th and 21st days), comparably to the use of povidone-iodine ($p<0.001$).

Key words: antimicrobial, antiseptics, burns, decamethoxinum, povidone-iodine, toll-like receptors.

Introducere

În prezent, perioada postoperatorie la pacienții cu combustii și complicațiile care se pot produce reprezintă obiectul cercetărilor, efectuate de oamenii de știință din diferite domenii: chirurghi, microbiologi, biochimisti, morfologi. Tratamentul pacienților cu arsuri grave este o sarcină dificilă din cauza dezvoltării frecvente a complicațiilor infecțioase [1]. O creștere a duratei de spitalizare duce, în mod inevitabil, la o creștere de 10 ori a riscului de infecție nosocomială [2]. Tulpinile clinice gram-negative multirezistente de *P. aeruginosa* (29%), *Acinetobacter spp.* (9%), *Klebsiella spp.* (8%), *Enterobacter spp.* (7%), *Proteus spp.* (6%) se referă la cei mai periculoși agenți patogeni ai complicațiilor infecțioase nosocomiale la pacienții departamentului de combustiologie [3, 4].

Studiile din ultimii ani au demonstrat rolul deosebit în al tiparelor moleculare, asociate arsurilor (PMMALA/DAMPs) și celor asociate patogenului (MAMP/PAMPs). Moleculele care, în mod obișnuit, sunt găsite în interiorul celulelor, sunt eliberate în matricea extracelulară la leziunea tisulară. Unele dintre aceste molecule, pot acționa ca DAMP prin intermediul suprafețelor hidrofobe. PAMP în plăgile după arsuri reprezintă un produs al agenților patogeni, care intră în straturile adânci ale dermei prin bariera epidermică. Coloniile microbiene ale plăgilor, în perioada postoperatorie, stimulează creșterea PAMP în sânge [5].

Activarea receptorilor toll like (TLR) are loc în prezența moleculelor de semnalizare DAMP și PAMP în circulația sistemică. Activarea TLR, la rândul lor, stimulează secreția de citokine. Creșterea concentrațiilor de TLR în ser duce la o creștere semnificativă a citokinelor sistemice, ulterior, la un răspuns imun inadecvat, la tulburări de vindecare și la cicatrizare excesivă. La om, se cunosc șase tipuri de TLR, care sunt localizate pe suprafața celulară (TLR 1, 2, 4, 5, 6 și 10). Alte TLR-uri (3, 7, 8, 9) sunt în endosomi și în senzorii acizilor nucleici [6]. A fost dovedit rolul semnificativ al TLR4 în inflamația sistemică secundară combustiilor și leziunilor organice [7, 8].

În cazul distrugerii sistemice generale a homeostaziei, răspunsul imun poate provoca sindromul de disfuncție poli-organică, care pune în pericol viața. Cunoașterea semnalizării DAMP și PAMP-TLR poate duce la îmbunătățirea tratamentului combustiilor. Abordările moderne privind tratamentul pacienților cu arsuri grave includ tratamentul chirurgical timpuriu, în combinație cu terapia de perfuzie-transfuzie, antibioterapia sistemică. O importanță deosebită are utilizarea locală a medicamentelor antimicrobiene eficiente, menite să reducă gradul de colonizare microbială a plăgilor. Eficacitatea antimicrobială joasă a tratamentului local al combustiilor, în condiții de reactivitate imună redusă, conduce la creșterea nivelurilor serice ale PAMP, TLR, citokinelor și formarea unui cerc vicios, care se manifestă clinic prin extinderea alterării, încetinirea însănătoșirii și agravarea prognosticului [9].

Scopul studiului a fost evaluarea dinamicii nivelurilor TLR4 și al colonizării microbiene la pacienții cu arsuri profunde, în cadrul managementului complicațiilor infecțioase, folosind decametoxinul drept antiseptic cu eliberare prelungită în plagă.

Introduction

Nowadays, the postoperative period in patients with burn disease and complications that may happen are the subject of research by scientists of different directions: surgeons, microbiologists, biochemists, morphologists. Management of the patients with severe burns is a difficult task due to the development of infectious complications in this contingent of the injured ones [1]. An increase in the duration of hospitalization inevitably leads to an increase in the risk of nosocomial infection to 10 times [2]. Polyantibiotic-resistant gram-negative clinical strains of *P. aeruginosa* (29%), *Acinetobacter spp.* (9%), *Klebsiella spp.* (8%), *Enterobacter spp.* (7%), *Proteus spp.* (6%) are referred to the most dangerous pathogens of infection complications, mediated with medical care, in patients of the burn department [3, 4].

Studies of recent years have shown a special role in the pathogenesis of burn disease damage-associated molecular patterns (DAMPs) and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Biological molecules that normally are usually found inside cells as released into the extracellular matrix or as its part and which are disrupted after tissue damage. Some of these may function as a DAMP. Hydrophobic surfaces are considered to act as DAMPs. PAMPs in wounds after burn trauma been as parts or products of pathogens entering the deep layers of derma through the breached epidermal barrier. Microbial colonisations of wounds in post-surgery period has been proved to stimulate the elevation of PAMPs in blood [5].

The activation of toll-like receptors (TLRs) happens under the appearance of signalling molecules as DAMPs and PAMPs in systemic circulation. TLRs' activation in turn stimulates cytokine secretion. The elevation of TLRs' concentrations in serum leads to significant systemic cytokine increase, subsequent inadequate immune response, impaired healing and excessive scarring. In human, six TLRs are known to be located on the cell surface (TLR 1, 2, 4, 5, 6, and 10). Other TLRs (3, 7, 8, 9) are in endosomes and sense nucleic acids [6]. According to scientific the data the significant role of TLR4 in post-burn systemic inflammation and organ damage has been proved [7, 8].

The generally systemic disruption of homeostasis, immune response can cause life-threatening, syndrome of multi-organ dysfunction. Knowledge of DAMP- and PAMP-TLR signalling may lead to burn wound treatment improvement. The modern approaches to the treatment of patients with severe burns include early surgical treatment in combination with infusion-transfusion therapy, systemic antibiotic therapy; special importance belongs to the local use of effective antimicrobial drugs aimed at reducing the degree of microbial colonization of wounds. Insufficient antimicrobial efficacy of local treatment of burn wounds in conditions of reduced immune reactivity leads to an increase of serum levels of PAMPs, TLRs, cytokines and the formation of a vicious circle, which is clinically manifested by the extension of the alteration, slowing down the reparation, worsens the prognosis [9].

The aim of the study was to evaluate the dynamics of TLR4 levels and microbial colonization in patients with deep burns under the management of infectious complications using the application of antiseptic decamethoxinum with prolonged delivery into the wound.

Material si metode

Design-ul studiului

În decursul unei perioade de șapte ani (2011-2017), au fost înrolați în studiu pe o durată de peste 21 de zile, 78 de pacienți critici cu combustii de gradul 2b-3 (suprafață corporală totală arsă de la $17,1\pm 0,6\%$ până la $65,0\pm 7,6\%$, care au fost spitalizați în Centrul de Combustii al Spitalului Clinic Regional Vinița, numit în cinstea lui N. I. Pirogov.

Toți pacienții au fost tratați în conformitate cu protocoalele de tratament al combustiiilor și au beneficiat de următoarele intervenții chirurgicale: necrectomia timpurie în primele trei zile după traumă și plastia cu grefă de piele liberă proprie sau străină. Măsurile de terapie intensivă: suport volemic și reechilibrare hidroelectrolitică, transfuzie, medicație simptomatică, pentru stabilizarea homeostaziei și antimicrobiene, sistemic.

În funcție de managementul topic postoperator, s-au format 2 grupe de pacienți. În primul grup, cel de referință, pacienții au primit pe suprafețele plăgilor povidon-iodonat, pansamente uscate-umede și remedii de vindecare a plăgilor. Grupul de referință a inclus 33 de pacienți cu vârsta variind între 25 și 101 ani și o medie de $45,2\pm 2,6$ ani, dintre ei – 84,4% bărbați și 15,2% femei. Pacienții din al doilea grup, cel de observație (n=45) au beneficiat de aplicații topice antimicrobiene cu decametoxin (1,10-Decametilin-bis (N,N-dimetil mentoxicarbonilmetil)-amonium diclorid). Certificatul deregistrare № UA/12180/01/01 din 29.03.2017, Ordinul Ministerului Sănătății al Ucrainei № 341). Aplicarea pansamentelor cu decametoxin (AMC) a fost efectuată în conformitate cu metoda originală elaborată, brevetată în Ucraina (Brevetul Nr. 93662). De asemenea, s-au administrat remedii standard pentru vindecarea plăgilor, conform protocoalelor clinice instituționale în vigoare. Pansamentele impregnate utilizate au avut proprietăți de eliberare prelungită a decametoxinului pe suprafața plăgii. Vârsta pacienților din grupul principal a variat între 23 și 86 de ani (vârsta medie $50,2\pm 1,9$ ani), dintre care 62,2% – bărbați, 37,8% – femei. Schimbarea pansamentelor în ambele grupuri a fost efectuată, în funcție de eliminări, zilnic sau peste o zi.

Agenți patogeni microbieni ai complicațiilor infecțioase au fost izolați din exudatul plăgii în timpul pansamentelor. Microorganismele au fost studiate minuțios, conform proprietăților lor tinctoriale, de cultură și biochimice, în conformitate cu abordările și tehnicile uzuale ale practicii microbiologice. Această parte a cercetării a fost efectuată în Laboratorul Bacteriologic al Departamentului de Microbiologie al Universității Naționale de Medicină Memorială Pirogov, Vinița. Gradul colonizării microbiene al plăgilor a fost examinat în ziua a 3-a, a 7-a, a 14-a și a 21-a de tratament.

În același timp, la pacienții din ambele grupuri (zilele 3, 7, 14, 21 de tratament), s-au prelevat probe de sânge din venă, pentru a măsura nivelul TLR4 în ser. Toate probele de ser obținute au fost conservate la -20°C în microtuburi Eppendorf, înainte de studiul biochimic. Pentru a analiza concentrația de TLR4, a fost aplicat testul ELISA în laboratorul științific și clinic din cadrul Departamentului de Chimie Biologică și Generală al Universității Naționale de Medicină Memorială Pirogov, Vinița. Serurile hemolizate, lipemice, precum și probele cu cheaguri de sânge nu au fost testate. Nivelul de TLR4 în ser a fost de-

Material and methods

Study design

During a seven year period (2011-2017) 78 critically ill patients with 2nd b – 3rd degree burns (total burned body surface area from $(17.1\pm 0.6\%)$ to $(65.0\pm 7.6\%)$ who were hospitalised in Burn Centre of Vinnytsya Regional Clinical Hospital named after N. I. Pirogov more than 21 day, were enrolled in the study.

All patients were treated according to protocols of the treatment of burn disease. They underwent surgery: early necrectomy in primary three days after trauma and xenodermograft, or autodermograft plastics were used. All patients received complex intensive care management: balanced infusion and transfusion therapy, symptomatic administrations for stabilization of their homeostasis and systemic antimicrobials.

Accordingly to the post-surgery topical management there were formed 2 groups of patients. In the first study group (comparison), patients received topical antiseptic povidone-iodine on the wound surfaces and after that wet-drying bandages and wound healing remedies were applied accordingly to the protocols of management of this pathology. The comparison group involved 33 patients (age extremes 25–101 years, middle age 45.2 ± 2.6 years; 84.4% male, 15.2% female). Patients of the second observation study group (n=45) underwent topical antimicrobial treatment with antiseptic decamethoxinum (1,10-Dekametilen-bis (N,N-dimethyl mentoxicarbonilmetil)-ammonium dichloride; registration certificate № UA/12180/01/01 since 29.03.2017, Order of Ministry of Health of Ukraine № 341). After that the next application of the gauze dressings, previously impregnated with the antimicrobial composition of decamethoxinum (AMC) was used accordingly to the patented original method (Patent of Ukraine No. 93662). And also standard wound healing remedies were administered (accordingly to the protocols). Used impregnated dressings, obtained the properties of prolonged desorption of antiseptic decamethoxinum in the wound surface. The age of patients in main group varied between 23 and 86 years (middle age 50.2 ± 1.9 years; 62.2% male, 37.8% female). The change of dressings in both groups was carried out depending on the impressions: daily or in a day.

Microbial pathogens of infectious complications were isolated from the wound exudate, had been received during dressing procedure. Microorganisms were studied in detail by their tinctorial, cultural, biochemical properties, according to the generally approved approaches and techniques in microbiological practice. This part of research was conducted in the Bacteriological laboratory of the Department of Microbiology of National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya. The level of microbial colonization of the wounds was examined on the 3d, 7th, 14th, 21st day of treatment.

At the same time in patients of both groups (3rd, 7th, 14th, 21st days of treatment), blood sampling from the vein was proceeded in order to measure the level of TLR4 in the serum. All received serum samples were conserved at temperature regimen 20°C below zero in Eppendorf micro tubes before biochemical study. To analyze the rates of TLR4 the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of blood samples was carried out in the scientific and clinical laboratory in the Department

terminat utilizând TLR4 uman cu ELISA Kit (NeoBiolab, USA) conform instrucțiunilor producătorului. Pe plăcile de microtitrare, cu anticorpi la estradiol adsorbite pe ele, a fost adăugat și amestecat timp de 10 secunde 100 μ l de soluții standard (concentrații de estradiol 0, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 25,0 ng/ml), 50 μ l de conjugat enzimatic (streptavidină de peroxidază). Godeurile acoperite au fost incubate timp de 60 minute în camera umedă, pentru a obține complexul anticorp-antigen-anticorp-enzimă. Fiecare godeu a fost spălat intens pentru a spăla reactivii fără conjugat. După aceea, în fiecare godeu, au fost adăugate 50 μ l de substrat cromogenic; probele au fost incubate timp de 15 minute la temperatura de 25°C. Reacția a fost oprită, utilizând 50 μ l de soluție stop. Densitatea optică a soluției a fost măsurată imediat, la 450 nm (filtrul diferențial a fost la 630 nm), folosind tehnica de testare STAT FAX 303/PLUS.

Analiza statistică a fost efectuată cu softul Statistica 6.0. S-au calculat: media aritmetică (M), eroarea medie a mediei aritmetice (m), veridicitatea rezultatelor (p).

Rezultate

În cadrul studiului, au fost identificate caracteristicile dinamicii colonizării plăgilor în timpul tratamentului cu aplicare locală a diferitor medicamente antimicrobiene. Au fost analizate rezultatele examinării bacteriologice cantitative ale exudatului la nivelul plăgilor la pacienții cu arsuri profunde. Gradul de infecție al plăgilor înainte de inițierea tratamentului a fost similar în ambele loturi. În medie, numărul de microorganisme la pacienții cu exudație la nivelul plăgii a fost de 5,6-7,3 UFC/ml. La pacienții cu o suprafață de arsură de 31-50%, în grupul de observație, numărul de microorganisme izolate din plagă a depășit indicele din grupul de comparație de 1,3 ori ($p < 0,05$) (Tabelul 1).

Tabelul 1. Gradul de colonizare microbială al arsurilor la diferite zile de prelevare a probelor în funcție de tratamentul topic.
Table 1. Degree of microbial colonisation of burned surfaces at different days of sampling according to local treatment.

Suprafața arsă Burned area	Zilele de prelevare a probelor / Days of probe sampling							
	Ziua 3 / Day 3		Ziua 7 / Day 7		Ziua 14 / Day 14		Ziua 21 / Day 21	
	Grupul decamethoxin Decamethoxine group	Grupul povidone-iodin Povidone-iodine group	Grupul decamethoxin Decamethoxine group	Grupul povidone-iodin Povidone-iodine group	Grupul decamethoxin Decamethoxine group	Grupul povidone-iodin Povidone-iodine group	Grupul decamethoxin Decamethoxine group	Grupul povidone-iodin Povidone-iodine group
1-20%	6,7±0,48	6,4±0,69	5,3±0,64	6,8±0,50	3,1±0,66***	6,3±0,58	0,7±0,36***	5,2±0,63
21-30%	6,3±0,63	6,8±0,24	5,2±0,57	6,3±0,76	2,2±0,77**	5,4±0,35	0,9±0,44***	5,8±0,73
31-50%	7,3±0,54*	5,6±0,60	6,6±0,61	5,9±0,80	5,4±0,62	6,4±0,64	2,4±0,53***	6,9±1,29
>50%	6,9±0,51	6,7±0,33	6,4±0,66	6,4±0,94	5,5±0,51*	7,3±0,20	4,3±0,89#	6,6±0,6

Notă: gradul colonizării microbiene este reprezentat prin Unități Formatoare de Colonii (UFC/ml), $M \pm m$; #– $p = 0,05$; *– $p < 0,05$; **– $p < 0,01$; ***– $p < 0,001$ (vs. grupul de comparație, cu povidon-iodin, la ziua respectivă).

Note: degree of microbial colonisation is presented as Colony Formatory Units (CFU/ml), $M \pm m$; #– $p = 0,05$; *– $p < 0,05$; **– $p < 0,01$; ***– $p < 0,001$ (vs. comparative group with povidone-iodine, at respective day).

Referitor la spectrul bacterian, izolat în această perioadă de la pacienții cu arsuri de până la 30% din suprafața corpului, acesta este reprezentat, preponderent, de *S. aureus*. La pacienții cu suprafața arsă mai mare de 30%, a fost izolat, preponderent, *A. baumannii*, care era, de obicei, în asociere cu microfloră de coci.

of Biological and General Chemistry of National Pirogov Memorial Medical University, Vinnitsya. All samples were appropriate for the research. Haemolysed, lipemic serum samples and samples with blood rolls were not tested. The serum TLR4 level was determined using the Human TLR4 Elisa Kit (NeoBiolab, USA) according to the manufacturer's instructions. Onto microtiter plates with adsorbed on them antibodies to estradiol, 100 μ l of standard solutions (concentrations of estradiol 0; 1.0; 2.5; 5.0; 10.0; 25.0 ng/ml), 50 μ l of enzymatic conjugate (streptavidine of peroxidase) were added and mixed during 10 seconds. Covered wells were incubated during 60 minutes in humid chamber to get antibody-antigen-antibody-enzyme complex. Each well had been washed intensively to wash out no-conjugated reagents. After that 50 μ l of chromogenic substrate were supplied in each well, had been incubated during 15 min at 25°C temperature regimen. Reaction was stopped using 50 μ l of stop-solution. Optical density of the solution was immediately measured at 450 nm (differential filter was at 630 nm.), using testing technique STAT FAX 303/PLUS.

Statistical analysis was conducted by means of Statistica 6.0. The arithmetic mean (M), the average error of the arithmetic mean (m), the reliability of the results (p) were calculated.

Results

In the study, we identified the features of the dynamics of wounds' colonization during treatment with local application of various antimicrobial drugs. Results of quantitative bacteriological examination of the wound exudate of patients with profound burns were analysed. Before treatment, burn wounds of both groups were infected, and the level of colonization of wounds was not statistically different in the experi-

mental groups. On average, the number of microorganisms in the wound exudate patients was 5.6-7.3 CFU/ml. Only in patients with a burn area of 31-50% in the observation group the number of microorganisms in the wound exceeded the index in the comparison group in 1.3 times ($p < 0.05$) (Table 1).

Regarding the species structure of the wound microflora

În ziua a 7-a, nivelul colonizării microbiene a plăgilor pacienților din ambele grupuri a scăzut ușor și a fost de 5,2-6,8 UFC/ml ($p>0,05$), cu un mic avantaj numeric al grupului de observație, la 5 UFC/ml (care a fost criteriul pentru delimitarea stării de colonizare-infecție). Gama speciilor de microfloră a plăgii a fost reprezentată, preponderent, de asociații de microorganisme, în care locul de frunte a fost ocupat de *A. baumannii*.

În cea de-a 14-a zi, s-a demonstrat o scădere a colonizării microbiene a plăgilor la pacienții care au beneficiat de AMC, comparativ cu grupul de control ($p<0,01$). Din spectrul speciilor de asociații microbiene, a fost izolat *Corynebacterium spp.*, indicând la restaurarea microflorei normale a pielii în procesul de epitelizare a suprafeței plăgii.

În grupul de comparație, în ziua a 14-a și a 21-a s-a observat o creștere a gradului de infectare a suprafețelor de arsură, în pofida terapiei antimicrobiene sistemice și locale. Printre speciile selectate, au predominat *A. baumannii*, în asociere cu alte microorganisme. Tulpinile de *P. aeruginosa* au ocupat a doua poziție și au predominat în grupurile de pacienți cu arsuri dure, cu o suprafață mai mare de 30%.

La pacienții cu arsuri grave, concentrația serică a TLR4 nu a prezentat diferențe între grupuri către zilele 3 și 7 (creșterea nivelului TLR4 de la $7,19\pm 0,35$ la $9,82\pm 0,38$ ng/ml, în grupul de comparație și de la $6,83\pm 0,27$ la $9,35\pm 0,39$ ng/ml, în grupul principal, $p>0,05$). Această dinamică a reflectat severitatea leziunilor la pacienții din ambele grupuri (Tabelul 2, Figura 1).

in this period, it should be noted that at burns up to 30% of the wound mainly *S. aureus* was isolated, with severe lesions (the area of burn more than 30%) – dominated strains of *A. baumannii* mainly in associations with coxa microflora. On the 7th day the level of microbial colonization of wounds of patients of both groups slightly decreased and was 5.2-6.8 CFU/ml ($p>0.05$) with the advantage of the observation group, where the value close to 5 CFU/ml (the criterion for the delineation of colonization-infection).

Species range of wound microflora was represented mainly by associations of microorganisms, in which the leading place was occupied *A. baumannii*.

On the 14th day, a decrease in the level of microbial colonization of burn wounds of patients, in whom AMC was used, was proved in comparison to the control group ($p<0.01$). Among the species spectrum of microbial associations *Corynebacterium spp.* were identified, indicating the restoration of normal skin microflora in the process of epithelization of the wound surface.

In the comparison group, an increase in the level of infection of the burning surfaces was observed despite systemic and local antimicrobial therapy on the 14th and 21st day. Among the selected species *A. baumannii* in associations with other microorganisms prevailed. *P. aeruginosa* strains occupied the second position in the microbial landscape, which dominated in the groups of hard-burnt patients with a burn area of more than 30%.

During the investigation of the serum TLR4 concentration in patients with severe burns on the 3d and 7th day, no di-

Tabelul 2. Nivelele de TLR4 la pacienții cu combustii în funcție de tratamentul antimicrobian topic al arsurilor.

Table 2. TLR4 levels in patients with burns according to topical antimicrobial treatment of burned surfaces.

Grupuri studiate Study groups	TLR4, ng/ml (M±m)			
	Ziua 3 / Day 3	Ziua 7 / Day 7	Ziua 14 / Day 14	Ziua 21 / Day 21
Grupul povidon-iodonat (de comparație) Povidone-iodonate (comparison) group	7,19±0,35	9,82±0,38	10,59±0,41	9,43±0,45
Grupul decamethoxin (de observație) Decamethoxine (observation) group	6,83±0,27	9,35±0,39	7,18±0,24***	5,19±0,20***

Notă: ***- $p<0,001$ (vs. grupul de comparare, cu povidon-iodin, la ziua respectivă).

Note: ***- $p<0,001$ (vs. comparative group with povidone-iodine, at respective day).

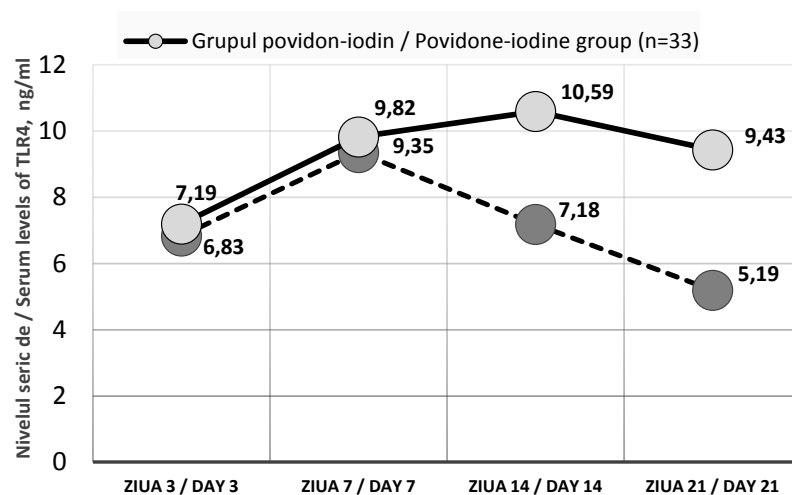


Fig. 1 Dinamica nivelelor serice de TLR4, în funcție de tratamentul antimicrobian topic al arsurilor grave.

Fig. 1 Serum level dynamics of TLR4, according to topical antimicrobial treatment of severe burns.

Cu toate acestea, la pacienții tratați cu AMC, de la a 14-a zi, a existat o scădere a nivelului moleculelor de semnalizare TLR4 la $7,18 \pm 0,24$ ng/ml ($p < 0,001$). În grupul de comparație, concentrația de TLR4 a fost stabilă, similar concentrației din ziua a 7-a ($10,59 \pm 0,41$ ng/ml), formând un platou pe grafic (Figura 1).

La 21 de zile, în grupul de observație, s-a identificat o scădere suplimentară a concentrației de TLR4 ($5,19 \pm 0,20$ ng/ml, $p < 0,001$), care a fost aproape de valorile normale ($4,5-5,0$ ng/ml). Această tendință poate fi explicată prin începutul proceselor de reparare a plăgii după 7 zile, eradicarea microorganismelor gram-negative patogene din plagă și substituirea acestora cu reprezentanți ai microflorei cutanate normale (*Corynebacterium spp.*), în cazul aplicării AMC.

Pentru pacienții din grupul de comparație, chiar și în ziua 21, concentrația de TLR4 a fost menținută la nivele similare a zilelor 7 și 14 ($9,43 \pm 0,45$ ng/ml), ceea ce poate fi explicat prin persistența agenților patogeni gram-negativi nosocomiali (*P. aeruginosa*) în exudatul plăgilor arse.

Discuții

Nivelul colonizării microbiene a suprafeței plăgii este elementul cheie în ciclul vicios al patogenezii complicațiilor infecțioase. Algoritmul patogenezii are următoarea secvență: agenți patogeni microbieni → PAMP serici → TLR → citokine → prelungirea alterării și duratei inflamației → extensie de reparare → spitalizare de lungă durată → dobândirea microflorei oportuniste.

Terapia antimicrobiană locală standard nu a avut efectul așteptat asupra eliminării microorganismelor și nu a împiedicat colonizarea plăgii cu microflora spitalicească (*P. aeruginosa*) în grupul de comparație.

În grupul de observație, de la 7 zile, la pacienții cu arsuri de până la 30% din suprafața corporală sau, de la 14 zile, la pacienții cu suprafața arsă mai mare de 30%, numărul de microorganisme, care au avut potențialul de a provoca infecții la nivelul plăgilor, a scăzut. Spectrul speciilor de microorganisme izolate a fost îmbogățit cu tulpinile reprezentanților gazdei, cum ar fi *Corynebacteria*, care, în opinia noastră, reflectă o tendință pozitivă de reparare a plăgilor, deoarece a arătat restaurarea microflorei normale a pielii în zona defectului.

Conform rezultatelor obținute, concentrația înaltă de TLR4 poate fi interpretată ca un marker al inflamației dăunătoare țesuturilor și al gradului de colonizare cu microorganisme. Nu s-au constatat diferențe în concentrația de TLR4 între grupurile de studiu până în a 14-a zi. Presupunem că în prima săptămână după combustie, rolul principal în patogeneză nivelurilor de creștere a TLR4 aparține DAMP-urilor. În timp ce, în cea de-a doua și a 3-a săptămână, diferențele în gestionarea infecției plăgilor au condus la modificările aparenței microbiene. Concentrațiile serice ale TLR4, în această perioadă, reflectă nivelul colonizării microbiene al plăgilor (PAMP de tulpini gram-negative).

În conformitate cu datele din literatura științifică timpurie, dedicate cercetărilor privind semnalizarea țesutului ars, s-au găsit numeroase DAMP-uri și PAMP-uri care activează TLR-uri. Datorită lor, au fost descifrate structurile cristaline ale unor

ferențe were found between the groups: a rise in the TLR4 level from $7,19 \pm 0,35$ to $9,82 \pm 0,38$ ng/ml in comparison group and from $6,83 \pm 0,27$ to $9,35 \pm 0,39$ ng/ml in the main group ($p > 0,05$) were observed. This dynamics indicated the severity of burn injury in patients of both groups (Table 2, Figure 1).

However, since the 14th day, there was a decrease in the level of TLR4 signalling molecules to $7,18 \pm 0,24$ ng/ml in patients treated with AMC ($p < 0,001$). In the comparison group, the concentration of TLR4 was maintained at the 7th day ($10,59 \pm 0,41$ ng/ml), forming a plateau on the graph (Figure 1).

At 21 days in the observation group, a further decrease in the TLR4 concentration ($5,19 \pm 0,20$ ng/ml, $p < 0,001$) was observed, which was close to normal values ($4,5-5,0$ ng/ml). This tendency can be explained by the beginning of reparative processes in the wound after 7 days, the eradication of conditionally pathogenic gram-negative microorganisms in the wound and their substitution with representatives of the normal skin microflora (*Corynebacterium spp.*) in the application of AMC.

For patients in the comparison group, even at day 21, the concentration of TLR4 was kept at 7 and 14 days ($9,43 \pm 0,45$ ng/ml), which can be explained by the release of the wound exudate in patients with severe burns of nosocomial gram-negative pathogens of infectious complications (*P. aeruginosa*).

Discussion

The level of microbial colonization of the wound surface is a key link in the vicious cycle of the pathogenesis of infectious complications. The algorithm of pathogenesis has the following sequence: microbial pathogens → serum PAMPs → TLRs → cytokines → prolongations of alteration and inflammation duration → extension of repairation → long lasting hospitalization → acquiring of opportunistic microflora.

Standard local antimicrobial therapy did not have the expected effect on the elimination of microorganisms and did not prevent colonization of the wound by hospital microflora (*P. aeruginosa*) in the comparison group.

In the observation group, from 7 day in patients with burns up to 30% of the body surface, or from 14 day in patients with burning surface more than 30%, the number of microorganisms that had the potential to cause wound infection, decreased, and the species spectrum of isolated microorganisms was enriched by strains of host representatives as *Corynebacteria*, which, in our opinion, seemed about positive tendency of wound repair, as it showed the restoration of normal microflora of the skin in the zone of defeat.

According to the results, obtained in the research, TLR4 concentration could be estimated as the marker of the tissue-damaging inflammation and the colonisation level of the microorganisms. No differences in TLR4 concentration were found between study groups till the 14th day. We suppose that during the 1st week after the burn trauma the main role in pathogenesis of the increase levels of TLR4 belongs to DAMPs. While during the 2d and the 3d week differences in the management of the wound infection lead to the changes of microbial landscape and serum TLR4 concentrations during this period reflect the microbial colonisation level of the wounds (PAMPs of gram-negative strains).

complexe PAMP-TLR [4]. În ceea ce privește DAMP-urile și PAMP-urile, aceste substanțe s-au referit la moleculele de semnalizare, responsabile de activarea răspunsului imun înăscut, protejând, astfel, țesuturile deteriorate de invazia microbiană și contribuind semnificativ la repararea plăgilor în postoperatoriu. Cu toate acestea, căile de semnalizare TLR influențează, de asemenea, inflamația asociată cu afectarea țesuturilor.

Concluzii

1) Colonizarea suprafețelor arse și a plăgilor după necrectomie, precum și imperfecțiunea mecanismelor locale de protecție în caz de arsuri grave, contribuie la dezvoltarea complicațiilor infecțioase, cauzate de asociații de microorganisme oportuniste: *S. aureus*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* etc. Aplicarea de pansamente impregnate cu compoziție antimicrobiană cu decameton cu eliberare prelungită, accelerează eradicarea eficientă a bacteriilor începând cu ziua a 7-a (în cazurile cu suprafața arsă de până la 30%) sau de la ziua a 14-a (dacă suprafața arsă este mai mare de 30%).

2) Aplicarea locală a preparatelor antimicrobiene cu eliberare prelungită a decametonului accelerează procesele reparative în plagă datorită reducerii colonizării microbiene din a 3-a zi și datorită reducerii inflamației în plagă, începând cu a doua săptămână, așa cum reiese din dinamica concentrației serice a moleculelor de semnalizare TLR4.

Declarația conflictului de interese

Nimic de declarat.

Contribuția autorilor

Toți autorii au contribuit în mod egal la elaborarea manuscrisului. Versiunea finală a fost citită și aprobată de toți autorii.

Accordingly to early scientific literature data dedicated to the researches of burned-tissue signalling, numerous DAMPs and PAMPs have been found to activate TLRs. Due to these, crystal structures of some PAMP-TLR complexes have been found [4]. As for DAMPs and PAMPs, these substances were referred to the signalling molecules responsible for activation of the innate immune response, protecting in this way damaged tissues from the invasion by microorganisms, and significantly contributing in the repair of burn-injured surfaces in postoperative period. Nonetheless, TLR signalling pathways also influence into inflammation related with damages of tissues.

Conclusions

1) The colonisations of burn surfaces and wounds after necrectomy surgery and the imperfection of local mechanisms of protection in severe burns contribute to the development of wound infection complications, caused by microorganisms in associations of such opportunistic bacteria *S. aureus*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* etc. But the topical management with application of dressings, impregnated by antimicrobial composition of decamethoxinum with prolongation desorption of this antiseptic into the wound optimizes the effective bacterial eradication, since 7 day (burn surface <30% BSA) or since 14 day (burn area >30% BSA).

2) Local application of antimicrobials with prolonged release of decamethoxinum accelerates the onset of reparative processes in the wound due to the reduction of microbial colonization from the 3rd day, and the reduction of the inflammatory period in the wound, starting from the second week, about as evidenced by the concentration of signalling molecules TLR4.

Declaration of conflicting interests

Nothing to declare.

Authors' contribution

All authors participated equally in research performing and manuscript writing. All authors have been read and accepted the final version of the manuscript.

Referințe / references

1. Yin S., Jiang B., Huang G., Gong Y. et al. Burn serum increases *Staphylococcus aureus* biofilm formation via oxidative stress. *Front. Microbiol.*, 2017; 8: 1191. doi: 10.3389/fmicb.2017.01191.
2. Church D., Elsayed S., Reid O., Winston B., Lindsay R. Burn wound infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2006; 19 (2): 403-434. doi: 10.1128/CMR.19.2.403-434.2006.
3. Yali G., Jing C., Chunjiang L., Cheng Z., Xiaoqiang L., Yizhi P. Comparison of pathogens and antibiotic resistance of burn patients in the burn ICU or in the common burn ward. *Burns*, 2014; 40 (3): 402-7. doi: 10.1016/j.burns.2013.07.010.
4. Nahaychuk V., Nazarchuk O., Paliy I., Burkot V., Honchar O. Do kharakterystyky suchasnykh uskladnen' u khvorykh z opikamy. *Ukrayins'kyy medychnyy chasopys*, 2014; 103 (5): 123-6. Available from: http://nbuv.gov.ua/UJRN/UMCh_2014_5_31.
5. Bianchi M. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukocyte Biol.*, 2007; 81: 1-5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17032697> DOI: 10.1189/jlb.0306164.
6. D'Arpa P., Leung K. Toll-like receptor signaling in burn wound healing and scarring. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*, 2017; 6 (10): 330-343. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29062590> doi: 10.1089/wound.2017.0733.
7. Breslin J., Wu M., Guo M., Reynoso R., Yuan S. Toll-like receptor 4 contributes to microvascular inflammation and barrier dysfunction in thermal injury. *Shock*, 2008; 29: 349-355. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25440843> DOI: 10.1016/j.burns.2014.05.008.
8. Shen L., Cui Z., Lin Y., Wang S., Zheng D., Tan Q. Anti-inflammatory effect of glycyrrhizin on rat thermal injury via inhibition of high-mobility group box 1 protein. *Burns*, 2015; 41: 372-378. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20500883> doi: 10.1186/1476-9255-7-25.
9. Rafla K., Tredget E. Infection control in the burn unit. *Burns*, 2011; 37 (1): 5-15. doi: 10.1016/j.burns.2009.06.198.