

ДОБРЕЙКИН

Евгений Алексеевич

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ
СОЧЕТАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ
И НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ
ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ
ИНФИЦИРОВАННЫХ ОЖОГОВЫХ РАН КОЖИ**

(экспериментальное исследование)

14.01.17 – хирургия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Воронеж 2014

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, профессор **Алипов Владимир Владимирович**

Официальные оппоненты:

Капралов Сергей Владимирович - доктор медицинских наук, НОУ ВПО «Медицинский институт «РЕАВИЗ», кафедра хирургических болезней, профессор

Андреев Александр Анатольевич доктор медицинских наук, ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра общей хирургии, профессор

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр лазерной медицины Федерального медико-биологического агентства».

Защита диссертации состоится 18 февраля 2015 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.009.01 при ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 394036, Россия, г. Воронеж, ул. Студенческая, 10.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте академии по адресу: <http://www.vsmaburdenko.ru/>.

Автореферат разослан «__» «_____» 2015 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

Глухов Александр Анатольевич



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Проблема лечения инфицированных ран на протяжении многих лет была и остается одной из актуальнейших проблем хирургии (Алексеев А.А., 2010; Колсанов А.В., 2011; Burtin P.R., 2011). Особые трудности представляет выбор способа местного лечения ожоговой раны. Важным условием эффективности лечения является понимание морфогенеза процесса заживления ожоговой раны, особенно в условиях её инфицирования (Switzer W., 2009; Ehrick W., 2012; Wang X., 2012). Для лечения ожоговых ран во второй фазе раневого процесса предлагаются, прежде всего, антибактериальные препараты для местного применения в составе повязок, мазей или раневых покрытий благодаря простоте их применения, доступности и экономической целесообразности (Островский Н.В., 2010; Каскаев А.В., 2011; Tassara G., 2011). Однако приходится утверждать, что желаемая степень ранозаживляющего эффекта препаратов до сих пор не достигнута (Winkelhake I., 2010).

Для построения рационального алгоритма лечения необходимы экспериментальные исследования на модели инфицированной ожоговой раны. Наиболее простым из известных способов моделирования ожоговой раны является применение контактного воздействия нагретых металлических пластин (Большаков И.Н., 2009; Власов А.А., 2009), электрического бытового паяльника (Шин Ф.Е., 2009), использование пробирки с кипятком или сухого воздуха, нагретого до температуры 500°C (Моновцов И.А., 2004). Недостатками представленных способов моделирования ожоговой раны является сложность определения площади раны заданного размера, длительности процедуры стабильного нагрева и неконтролируемость глубины ожога. До настоящего времени не проводились экспериментальные исследования, направленные на моделирование инфицированных ожоговых ран кожи.

Особый интерес при лечении ран кожи вызывают низкоэнергетические лазеры, в частности гелий-неоновый лазер (Москвин С.В., 2003; Шатманов Н.А., 2008, Бриль Г.Е., 2013). Эффект низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) связан с улучшением микроциркуляции, стимуляцией регенерации ран, снижением сроков заживления ран (Венгерович Н.Г., 2011). Обычно позитивный эффект достигается при ежедневном местном облучении области раны, начиная со вторых суток после появления тканевого дефекта (Бриль Г.Е., 2013).

В литературе всё большее внимание уделяется перспективам развития нанотехнологий, которые в медицине стали применяться сравнительно недавно (Pustovaliv V., 2004; Tuchin V., 2009). Сегодня доказано микробицидное и цитотоксическое действие наночастиц меди на микроорганизмы: синегнойную палочку (*Pseudomonas aeruginosa*), золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) (Богословская О.А., 2014; Фролов Г.А., 2014; Lin Ch., 2008). Именно эти микроорганизмы наиболее часто и вызывают инфицирование ран (Дульцева Т.С., 2010; Бабушкина И.В., 2011).

В настоящее время изучено множество особенностей применения и биологически активных эффектов различных нанопрепаратов: антибактериальный (Мамонова И.А., 2012), иммуномодулирующий (Lin W., 2008), антиоксидантный (Толстых М.П., 2002) и др. Однако, большинство наноматериалов как биоцидных агентов, в частности наночастицы меди, изучены недостаточно (Богословская О.А., 2014). Не установлены, в частности, общие биологические эффекты и оптимальные концентрации при их использовании на живых объектах (Венгерович Н.Г., 2011). Актуальным представляется сочетанное применение лазерных и нанотехнологий, использование их потенцирующей антимикробной активности, что позволит оптимизировать динамику раневого процесса. Экспериментальных исследований и работ, посвященных изучению сочетанного применения лазерных и нанотехнологий на модели инфицированных ожоговых ран кожи до настоящего времени не проводилось.

Цель исследования: экспериментально обосновать эффективность сочетанного применения низкоинтенсивного лазерного излучения и наночастиц меди при хирургическом лечении инфицированных ожоговых ран кожи.

Задачи исследования

1. Разработать экспериментальную модель контролируемой по глубине и площади инфицированной ожоговой раны с использованием высокоинтенсивного лазера «Lasermid 10-01».
2. Определить влияние НИЛИ, суспензии наночастиц меди и их сочетанного применения на выраженность антибактериального эффекта на культуру полиштамма *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* in vitro.
3. В условиях эксперимента на белых лабораторных крысах изучить клинические особенности, оценить антимикробную эффективность и

морфологическую динамику раневого процесса моделированной инфицированной ожоговой раны кожи при ее хирургическом лечении с местным применением НИЛИ, суспензии наночастиц меди и их сочетанным использованием.

4. Обосновать целесообразность сочетанного применения НИЛИ и суспензии наночастиц меди в послеоперационном периоде лечения инфицированных ожоговых ран кожи.

Научная новизна исследования

Для получения в эксперименте научно обоснованных результатов лечения ожогов кожи впервые разработан «Способ моделирования термической ожоговой раны кожи у лабораторных животных» (патент РФ на изобретение № 247232), в результате чего разработана экспериментальная модель контролируемой по глубине и площади инфицированной ожоговой раны с использованием хирургического лазера.

Определено влияние НИЛИ, наночастиц меди и их сочетанного применения на выраженность антибактериального эффекта на культуры микроорганизмов *in vitro*.

В условиях эксперимента на белых лабораторных крысах оценена антимикробная эффективность и морфологическая динамика раневого процесса, определены особенности течения инфицирования ожоговой раны кожи, обоснована целесообразность её хирургического лечения в комбинации с применением НИЛИ и суспензии наночастиц меди.

Теоретическое и практическое значение работы

- В результате проведенного исследования определены параметры применения НИЛИ при моделированных инфицированных ожоговых ранах кожи.
- Для возможного дальнейшего практического использования в хирургии инфицированных ожоговых ран доказана эффективность применения суспензии наночастиц меди, включающие фрагменты от 60 до 80 нм, обладающих повышенной устойчивостью на воздухе.
- На основании установленной антимикробной эффективности и позитивной морфологической динамики раневого процесса определены

критерии местного сочетанного применения НИЛИ и наночастиц меди в послеоперационном периоде лечения моделированных инфицированных ран кожи. Обоснована эффективность разработанного в эксперименте способа комбинированного хирургического лечения инфицированных ожоговых ран.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Контролируемое воздействие высокоинтенсивного лазера «Lasermid 10-01» на медную пластину позволяет обеспечить заданную площадь и глубину моделируемой ожоговой раны кожи.
2. Низкоинтенсивное лазерное облучение культуры *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* *in vitro* позволяет получить выраженный антибактериальный эффект при более низких концентрациях наночастиц меди (1-10 мкг/мл).
3. Местное применение НИЛИ и суспензии наночастиц меди при хирургическом лечении инфицированных ран кожи в эксперименте ускоряет купирование инфекционно-воспалительного процесса, появление грануляций, эпителизацию раны и сокращает сроки лечения.

Внедрение результатов исследования

Предложенный способ моделирования инфицированной ожоговой раны кожи применялся в ходе научных исследований на кафедре оперативной хирургии и топографической анатомии Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского и может использоваться в экспериментальной хирургии.

Материалы проведенных исследований включены в лекции и практические занятия при обучении студентов 2-4 курсов на кафедрах общей хирургии, оперативной хирургии и топографической анатомии Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на межрегиональной 72-й научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием (Саратов, 2011, 2012); межрегиональной научной конференции с международным участием «Новые технологии в экспериментальной и клинической хирургии» (Саратов, 2011); VIII международной научно-практической конференции «Актуальные

проблемы современной науки» (Pizemysl, Польша, 2012); международном медицинском Конгрессе «Evromedica-2012», Hannover, Германия, 2012); международной научно-практической конференции с международным участием (Харьков, 2011, 2013); международной научно-практической конференции с международным участием (Ялта, 2013); международной научной конференции (Мюнхен, Германия, 2013).

Апробация результатов исследования проведена на расширенном заседании проблемной комиссии (27.10.2014г.) с участием кафедр оперативной хирургии и топографической анатомии, общей хирургии, скорой медицинской и анестезиолого-реанимационной помощи ФПК и ППС, хирургии и онкологии ФПК и ППС, факультетской хирургии и онкологии лечебного факультета, госпитальной хирургии и патологической физиологии СГМУ. Положительная оценка работы получена на заседании Саратовского хирургического общества имени С.И.Спасокукоцкого (30.10.2014г.)

Публикации

По теме диссертации опубликованы 34 научные работы, в том числе 9 – в журналах, входящих в перечень периодических научных и научно-практических изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, получен Патент РФ на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и приложения. Список литературы включает 228 литературных источников, из них 137 отечественных и 91 иностранных авторов. Работа иллюстрирована 5 таблицами и 38 рисунками.

Связь с планом научных исследований. Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательской работы кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России (номер государственной регистрации ИК 40210203946) и при научно-методической и финансовой поддержке Гранта инновационно-инвестиционного фонда Самарской области (2011).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Характеристика экспериментальных исследований

Экспериментальный хирургический раздел работы, включивший исследования на 200 белых лабораторных крысах, выполнен на базе кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, а микробиологические и морфологические исследования проведены совместно с НИИ «Институт экспериментальной медицины и биотехнологий» ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России (директор – проф. Л.Т. Волова).

В ходе работы использованы «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложения к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755) и Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123), г. Страсбург, 18.03.1986 г. Исследование имеет рекомендацию и положительное заключение комитета по этике ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России (протокол № 1 от 5 сентября 2011 года).

1. **Применение НИЛИ при лечении ожоговых ран in vitro и in vivo** осуществляли согласно собственные исследования с рекомендациями С.В. Москвина (2003). В результате проведенных 52 исследований с применением терапевтического лазерного аппарата АЛТ «Матрикс», тип МЛ01КР, нами определены параметры, пригодные для его использования, как изолированно, так и в сочетании с нанопорошком меди: частота – 80 Гц, импульсная мощность излучения – 15 Вт, длина волны – 635 нм. В экспериментах in vivo при лечении низкоинтенсивного лазера применяли обозначенные параметры. Сеансы проводили через день по 2 минуты каждый в течение 14 дней.

2. **Получение и применение наночастиц меди.** Нанопорошок меди с дисперсностью 60-80 нм получен с помощью плазменной технологии из крупнодисперсного порошка марки ПМС 1 ГОСТ 490-75. Таким способом удаётся получить ультрадисперсный порошок меди, состоящий из её кластеров, включающих фрагменты от 60 до 80 нм, обладающих повышенной

устойчивостью на воздухе. Порошок предоставлен ФГУП РФ ГНЦ ГНИИ химической технологии элементоорганического синтеза (г. Москва). Исследования свойств нанопорошка меди *in vitro* и суспензии наночастиц меди *in vivo* проводили совместно с кафедрой аналитической химии СГУ (С.Ю.Доронин, Р.К.Чернова).

Суспензию наночастиц меди получали при смешении эфирного подсолнечного масла (стерилизованного) с 1 мг наночастиц меди в концентрации от 1000 мкг/мл до 1 мкг/мл. Данная суспензия наносилась на поверхность инфицированной раны в указанной дозе ежедневно каждому животному.

3. Исследование антибактериального действия сочетанного применения наночастиц меди и НИЛИ. Проведены 120 исследований в экспериментах *in vitro*, направленных на изучение сочетанного влияния НИЛИ и наночастиц меди на культуры микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Контролем (первая серия эксперимента, 30 исследований) служила культура микроорганизмов без воздействий и добавок. Вторая серия – оценка влияния НИЛИ на рост колоний микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* (30 исследований). Третья серия – изучение влияния различных концентраций наночастиц меди на рост колоний микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* (30 исследований). Четвертая – оценка возможности усиления антимикробного действия низких концентраций наночастиц меди после применения НИЛИ (30 исследований).

В ходе экспериментов *in vitro* проведен сравнительный анализ ультрадисперстного порошка меди на лабораторный полиштамм *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Готовили взвесь нанопорошка в 0,9% растворе NaCl в концентрациях от 0,001 до 1 мг/мл. Результаты подсчета выросших колоний на твердых питательных средах учитывали после 60-180 мин воздействия наночастиц меди и в контроле без применения порошка.

Сразу и через 1, 2, 3 часа культивирования производили мерный высеv на чашки с мясо-пептонным агаром и через 24 часа инкубации при 37⁰С в условиях перемешивания подсчитывали количество выросших колоний. Использовали стандартизованную суспензию микроорганизмов, полученную смешением суточных культур *Pseudomonas aeruginosa* и

Staphylococcus aureus (по $9 \cdot 10^8$ КОЕ/мл). Конечная концентрация $3 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Во второй серии экспериментов культуру микроорганизмов облучали две минуты аппаратом АЛТ «Матрикс», тип МЛ01КР в режиме: частота – 80 Гц, импульсная мощность излучения – 15 Вт, длина волны – 635 нм, экспозиция – 2 мин. В третьей серии экспериментов в культуру микроорганизмов вносили по 0,2 мл суспензии нанопорошков меди с конечными концентрациями 1000, 100, 10 и 1 мкг/мл. В четвертой серии исследований сочетали облучение лазером «Матрикс» в названных режимах и внесение указанных выше количеств суспензии наночастиц меди.

4. Клинико-морфологическая оценка экспериментальных моделей неосложненной и инфицированной ожоговых ран кожи. В первой серии экспериментов на 50 лабораторных крысах был разработан способ (Патент РФ на изобретение № 247232), состоящий в следующем. Белой лабораторной крысе под двухкомпонентным наркозом в межлопаточном пространстве спины сбивается шерсть, кожа обрабатывается спиртом, размечается и бреется участок кожи, к коже подводят насадку – медную пластинку площадью 400 мм и толщиной 1 мм и через торец световода лазера («Лазермед 10-01») контактно воздействуют на нее излучением длиной волны 1064 нм в постоянном режиме, мощностью на торце световода 15 Вт. Под контролем тепловизора пластинка нагревается до 220°C , после чего выдерживается на коже еще в течение 2-3 секунд. Таким образом, при 2-3-х секундной экспозиции лазерного воздействия на пластину моделируется ожог всех слоев кожи (ожог ШБ степени), что верифицировано полученными нами морфологическими данными (рис. 1).

Модель гнойной ожоговой раны создавали следующим образом. На третьи сутки после создания ожога, проводили раннюю хирургическую некрэктомию и инфицировали раны лабораторными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Для этого из суточных агаровых культур по оптическому стандарту мутности МакФарланда готовили суспензию в физиологическом растворе хлорида натрия в конечной концентрации $3 \cdot 10^7$ КОЕ/мл и суспензией в объеме 0,1 мл взвеси однократно орошали рану.

5. Изучение влияния сочетанного применения наночастиц меди и низкоинтенсивного лазерного излучения. Определение клинико-морфологических особенностей моделированной лазером ожоговой раны ШБ

степени изучали при неосложненной и инфицированной ожоговых ранах на протяжении 14 суток после нанесения ожога. Исследования проведены на 150 белых лабораторных крысах (массой 190-200 г) в 5 сериях экспериментов (по 30 животных в каждой серии). Животным после создания инфицированной термической ожоговой раны в течение 14-ти дней проводили низкоинтенсивное лазерное облучение раны (первая серия животных), нанесение суспензии наночастиц меди (вторая серия), сочетанное воздействие лазерного облучения и суспензии наночастиц меди (третья серия) (рис. 2), лечение мазью «Левомеколь», как препаратом сравнения (четвертая серия).



Рис. 1. Моделированная инфицированная рана кожи
(ожог ШБ ст.)



Рис. 2. Сочетанное воздействие НИЛИ
и суспензии наночастиц меди
(эксперимент третьей серии)

Контролем (пятая серия) служили животные, которым проводили только хирургическую обработку раны, включающую некрэктомию и промывание раны антисептиком.

Для комплексной оценки течения раневого процесса в исследовании использовали методы планиметрического и микробиологического, исследования ран, которые осуществляли на 3-и, 7-е и 14-е сутки, ежедневно оценивали общее состояние животных. Бактериологическое исследование гнойных ран включало изучение качественного состава микробных возбудителей и количественный учет микроорганизмов. Также учитывались следующие параметры течения раневого процесса: наличие и характер воспалительной реакции, состояние краев и дна раны, сроки очищения раны от некротических тканей и появления грануляций, характер грануляционной ткани, сроки начала и полной эпителизации ран. При проведении планиметрических исследований использовали устройство в виде рамки с

размеченной сеткой из прозрачного стерильного полиэтилена площадью 400 мм.² Для качественной оценки восстановления раневого дефекта у экспериментальных животных в динамике пленки сканировали, а площадь раны рассчитывали с помощью компьютерной программы Image Y/30v.

Статистическую обработку результатов проводили вариационно-статистическим методом с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0» (StatSoft Inc., USA) и Microsoft Office Excel 2007 на IBM PC/AT «Pentium-IV» в среде Windows XP. Для определения вида распределения количественных данных использовали критерий Шапиро-Уилка, параметрический (критерий Фишера – Снедекора) и непараметрические статистические критерии (Манна – Уитни, критерий Вилкоксона для парных сравнений) – независимо от формы распределения. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка антибактериального действия

низкоинтенсивного лазерного излучения и наночастиц меди и их сочетанного применения в эксперименте *in vitro*.

Первая серия эксперимента: культура микроорганизмов без воздействий и добавок. В результате применения НИЛИ (эксперимент второй серии) установлено, что полученные количества выросших колоний сразу после посева существенно не отличались от контроля. Через 1 и 2 часа культивирования после лазерного облучения отмечалось снижение количества колоний опытного штамма до $Me = 99$ и 1212 ($p < 0.05$) соответственно, однако, на третьем часе рост культур микроорганизмов возобновлялся. Таким образом, эффективность действия лазера констатирована только в течение одного часа, а антибактериальные свойства изолированного НИЛИ признаны недостаточно эффективными.

Эксперимент третьей серии: через 24 часа инкубации при $37^{\circ}C$ высеянных на чашки Петри микроорганизмов, предварительно культивированных 1 час в присутствии ультрадисперсного порошка меди в концентрации 1000, 100 и 10 мкг/мл, отмечалось соответствующее достоверное снижение количества колоний до $Me=423$, 1540 и 2446, соответственно, по сравнению с контролем ($p < 0,05$), где отмечался рост в виде газона (сплошной рост). Подобная тенденция сохранялась через 2 и 3 часа культивирования. Нанопорошок меди в

концентрации 1 мкг/мл не оказывал полноценного влияния на рост опытных культур. Таким образом, в ходе исследования было показано, что опытные концентрации нанопорошков меди (1000 – 10 мкг/мл) вызывают резкое сокращение количества микробных клеток *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* уже в первые часы контакта с культурой при полном подавлении роста через 3 часа воздействия.

В четвертой серии эксперимента (сочетание лазерного облучения с опытными концентрациями нанопорошков 1000, 100 и 10 мкг/мл) через 1 час культивирования отмечено снижение количества клеток до $Me\ 34, 125$ и 2267 соответственно с последующим отсутствием колоний уже на 2 часу культивирования в концентрации 1000 и 100 мкг нанопорошка меди ($p < 0,05$). Через 3 часа рост отсутствовал в концентрациях нанопорошка 1000, 100 и 10 мкг/мл, как при воздействии облучения, так и без него. Применение нанопорошка меди в концентрации 1 мкг/мл после использования НИЛИ указанных параметров приводило к десятикратному снижению числа колоний на третьем часу согласно времени посева.

Таким образом, проведение сеансов лазерного облучения на культуры *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* способствовало существенному повышению антимикробной активности суспензии наномеди в концентрации от 1000 до 10 мкг/мл. Эффективность применения наномеди в концентрации 1 мкг/мл посева не столь высока: на 3-м часу эксперимента констатировано значительное снижение числа колоний, однако полного отсутствия роста не получено. Использование сеансов НИЛИ и последующее применение суспензии наномеди позволяет получать антибактериальный эффект при более низких (1 мкг/мл) концентрациях наночастиц меди, что позволит снизить тем самым возможное токсическое действие данного вещества на организм в условиях *in vivo*.

Клинико-морфологическая оценка экспериментальной модели не леченной инфицированной ожоговой раны. При изучении клинических особенностей течения раневого процесса после инфицирования ожоговой раны (пятая серия эксперимента) на 3-и сутки после воспроизведения ожога установлено следующее. Ожоговая поверхность раны оставалась бледной, с редкими грануляциями, фибриновым налетом и подрытыми краями. У животных формировалась гнойная рана со всеми характерными признаками

гнойного воспаления: отмечался отек и гиперемия кожи в области нанесения раны.

На 7-е сутки после инфицирования ожоговая рана представляла собой бледную ткань, покрытую фибрином, имела место плазморрея. В течение всего срока наблюдения крысы оставались вялыми, пищу и воду почти не принимали. При исследовании гистологических препаратов, полученных с поверхности раны обнаружены стазированные полнокровные сосуды, визуализировалось пропитывание эритроцитами рубцовой ткани, формировались сосудистые петли в малом количестве. Анализируя процессы заживления раны через 14 суток после инфицирования ожоговой раны, признаков регенерации не выявлено, обсемененность раны сохранялась во всех наблюдениях.

Оценка эффективности НИЛИ, наночастиц меди и их сочетанного применения на ожоговую рану в эксперименте *in vivo*.

Важным показателем заживления инфицированной ожоговой раны является **динамика обсеменённости раны микроорганизмами** (рис.3). Бактериологическое исследование отделяемого из ран животных показало, что при сочетанном лечении (3-я серия эксперимента) происходит постепенное линейное снижение количества микроорганизмов в ране, максимально выраженное по сравнению с другими группами. Так, к 7-м суткам применения суспензии наномеди после проведения НИЛИ бактериальная обсемененность раны у животных 3-й серии была ликвидирована. Это подтверждает выявленный в экспериментах *in vitro* факт усиления лазерным излучением бактерицидного действия наночастиц меди.

В наших исследованиях бактериальная обсемененность раны была ликвидирована к 11-м суткам лазерного облучения и к 9-м суткам применения наночастиц меди. Полное прекращение роста при концентрации наномеди более 1,0 мкг/мл способствовало очищению ран на 2,0+0,7 суток раньше при использовании НИЛИ в сочетании с применением суспензии наномеди в сравнении со 2-ой серией экспериментов и на 6,2+0,5 суток в сравнении с контрольной группой. Однако данный эффект в эксперименте на животных был выражен в меньшей степени (по сравнению с экспериментом *in vitro*), что свидетельствует о необходимости назначения оптимальных концентрации наночастиц меди для лечения инфицированных ожоговых ран.

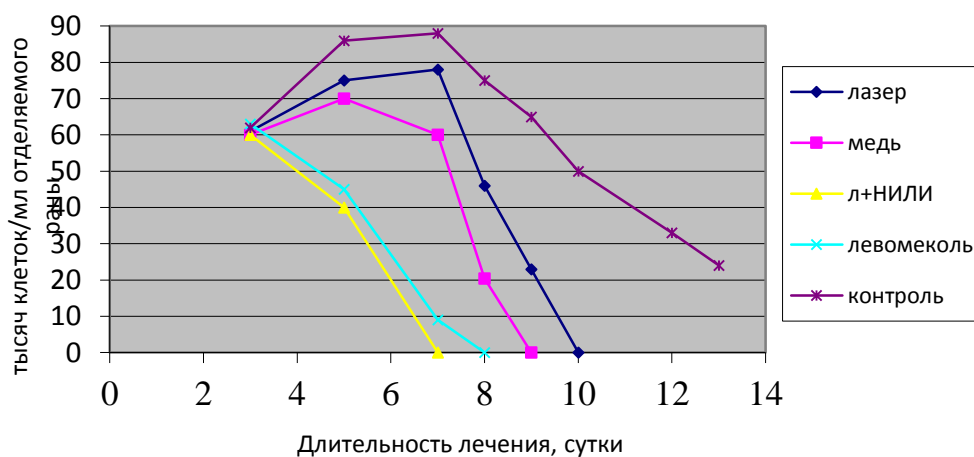


Рис. 3. Динамика микробной обсеменённости ран в сериях экспериментов

Оценка планиметрических характеристик ран в первой и второй сериях свидетельствует о том, что изолированное применение раневого покрытия в виде суспензии наночастиц меди обладает более эффективным лечебным действием, чем изолированное НИЛИ. Визуально, на 14-е сутки применения НИЛИ появилась тенденция эпителизации ожоговой поверхности от периферии к центру, тогда как во второй и четвертой сериях опытов отмечено формирование эпидермального слоя. В третьей серии эксперимента раневой дефект был выполнен рубцовой тканью, наблюдалась частичная (77%) краевая и полная (23%) эпителизация раны. При проведении планиметрического исследования динамика уменьшения площади ран к 14-м суткам при сочетанном применении НИЛИ и суспензии наномеди была наиболее заметной. Так, при изолированном применении лазерного излучения площадь моделированной инфицированной раны кожи (400 мм^2) сократилась к 7-м суткам до $168 \pm 20 \text{ мм}^2$, а к 14-м о до $91 \pm 8,0 \text{ мм}^2$. При назначении суспензии наномеди – соответственно до 162 ± 5 и до 72 ± 4 . При лечении мазью «Левомеколь» – до 173 ± 19 и до $75 \pm 18 \text{ мм}^2$ а при сочетанном использовании НИЛИ и наномеди до $125 \pm 22 \text{ мм}^2$ к 7-м суткам и до $41 \pm 14 \text{ мм}^2$ к 14-м суткам лечения. В группе контроля к 14-м суткам констатировано уменьшения площади ран лишь до $181 \pm 13 \text{ мм}^2$.

Клинико-морфологические особенности течения раневого процесса

К третьим суткам лечения, в первой и второй сериях экспериментов, в ране сохранялось воспаление, отек тканей с полнокровными сосудами и незначительным гнойным отделяемым из раны, невыраженная краевая репаративная активность. В четвертой серии эксперимента при

использовании мази «Левомеколь» отмечен выраженный отек тканей с гнойным отделяемым. При использовании НИЛИ в сочетании с суспензией наномеди (третья серия эксперимента) к 3-м суткам экссудата из раны было меньше, по периферии визуализировались редкие очаги грануляционной ткани. К 7-м суткам применения НИЛИ (первая серия опыта) в ране отмечено появление оформленной грануляционной ткани, особенно по краям раны. Во второй серии эксперимента к 6-м суткам лечения определялась грануляционная ткань по дну раны, на поверхности отмечены фибриновые тяжи. В четвертой серии опыта также дифференцировалась грануляционная ткань без наложений фибрина.

Применение НИЛИ и суспензии наномеди уже к 5-м суткам лечения привело к практически полному замещению раны грануляционной тканью без признаков экссудации, что свидетельствовало о переходе воспаления в завершающую стадию. Таким образом, применение суспензии наномеди обладает более эффективным лечебным действием, чем действие НИЛИ. В третьей серии эксперимента регенерация раны и сокращение её размеров наблюдались в более ранние сроки наблюдения, чем в сериях 1,2,4. Сопоставимыми являются результаты второй и четвертой серий с применением наносуспензий меди и мази «Левомеколь»: грануляции появились спустя 8 суток лечения, а начальная эпителизация констатирована лишь спустя 14 суток лечения

Гистологическая характеристика динамики заживления ран в сериях экспериментов. На третьи сутки от начала лечения с применением НИЛИ на фоне отека и лимфоцитарной инфильтрации формируется молодой рубец с фибробластами, фибрином, коллагеновыми волокнами и сосудистыми петлями. Во второй серии экспериментов при использовании суспензии наночастиц меди на 3 сутки в ране отмечены: субэпителиальный отек ткани, расширение сосудистых петель, все признаки не купированного воспаления. Подобная гистологическая картина выявлена и при использовании мази «Левомеколь». В третьей серии экспериментов к 3-м суткам в области дефекта деструктивные изменения проявлялись сформированными коллагеновыми волокнами, расширенными полнокровными сосудами и лейкоцитарной инфильтрацией, появились начальные признаки репаративных процессов.

На седьмые сутки во всех сериях экспериментов в ткани наблюдалось образование оформленной грануляционной ткани, коллагеновых волокон и вновь образованных сосудов. При лечении НИЛИ грануляционная ткань располагалась по краям раны. Во второй серии опытов при использовании суспензии наночастиц меди сохранялись участки фибробластов, скопления фибрина. В четвертой серии опытов в ране выявляли инфильтрацию тканей, большое количество макрофагов и нейтрофильных лейкоцитов, т.е. признаки сохраняющегося воспаления. В эксперименте третьей серии сочетанного лечения на фоне незначительного отека ткани имелись четкие признаки сформированной грануляционной ткани и полноценная сосудистая сеть, что подтверждало переход процесса в стадию эпителизации тканей. Наблюдаемое более раннее очищение раневой поверхности за счет формирования грануляционной ткани при проведении местного лечения в сериях эксперимента констатировано в следующей последовательности: использование НИЛИ – 10-е сутки, мази «Левомеколь» – 10-е сутки, суспензии наномеди – 9-е сутки. Наиболее выражен был процесс регенерации при сочетанном использовании НИЛИ и суспензии наномеди – к 6-7 суткам лечения.

На 14 сутки применения НИЛИ (1-я серия эксперимента) препарат представлен молодой соединительной тканью, большим количеством расширенных полнокровных сосудов, сохраняющейся лейкоцитарной инфильтрацией. После использования суспензии наномеди (2-я серия) под сформированной грануляционной тканью имеется формирование эпидермального слоя. После применения мази «Левомеколь» рана выполнена молодой грануляционной тканью, с большой капиллярной сетью микроциркуляторного русла и множеством коллагеновых волокон.

При сочетанном применении НИЛИ и суспензии наномеди уже к 12-м суткам лечения гистологическая картина представлена зрелой соединительной тканью и формирующимся эпителиальным пластом, а эпителизация раны отмечена к $11,8 \pm 1,0$ суткам. Итак, итоги третьей серии эксперимента показали, что переход процесса гнойно-воспалительных явлений в регенераторный период наблюдался на четверо суток раньше, чем во 2-ой и 4-ой сериях экспериментов, при этом отмечались сокращение размеров раны и сроков эпителизации в 1,5 раза (рис.4).

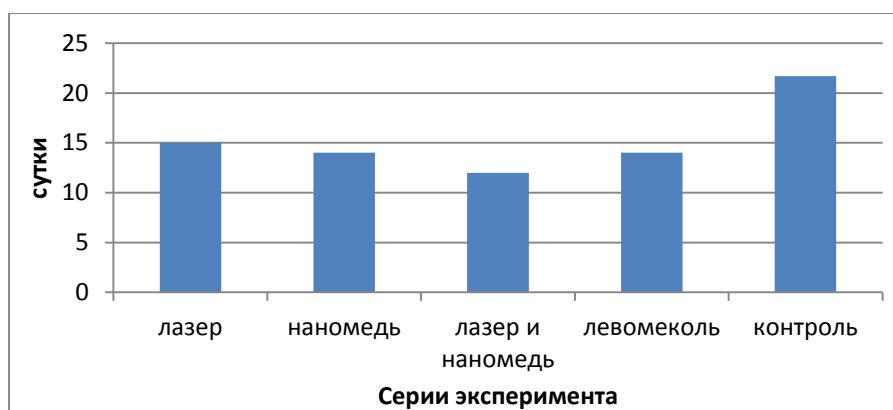


Рис.4. Сроки эпителизации инфицированных ожоговых ран в сериях эксперимента (сут.)

Таким образом, оценивая полученные результаты нами установлено, что сочетанное применение НИЛИ и суспензии наномеди проявляет наибольшую эффективность, в сравнении с результатами лечения животных других групп, на всех стадиях раневого процесса. При сочетании примененных методов возникает фотохимическая реакция с включением триггерного механизма усиления активности, прежде всего антибактериальной, наночастиц металлов (меди) на фоне облучения раны низкоинтенсивным лазером.

В первой стадии применение сочетанного лечения снижает отек, увеличивает плотность клеток воспалительного инфильтрата и укорачивает сроки данного периода регенерации. Во второй стадии раневого процесса отмечается интенсификация пролиферативных процессов и ускорение неоваскулогенеза и образования грануляционной ткани. В третьей стадии, при продолжении сочетанного лечения, констатирована максимальная активность репаративных процессов. Низкоинтенсивное лазерное воздействие и бактерицидная активность суспензии наномеди за счет интенсификации пролиферативной активности базальных клеток эпидермиса ускоряют процесс эпителизации и нарастания на грануляционную ткань так называемого вставочного эпидермиса. Важным отличием сочетанного лечения является одновременное воздействие на процессы пролиферации эпителиальных клеток, являющихся структурой рубцующейся раны кожи. Полученные экспериментально результаты сочетанного применения НИЛИ и суспензии наночастиц меди позволяют считать данный способ лечения перспективным альтернативным вариантом лечения инфицированных ран кожи.

ВЫВОДЫ

1. Разработана и запатентована экспериментальная модель контролируемой по глубине и площади инфицированной ожоговой раны с использованием хирургического лазера «Lazermed 10-01».
2. В эксперименте *in vitro* после проведения сеансов низкоинтенсивного лазерного облучения на культуру *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* снижен удельный вес микробной ассоциации и получен антибактериальный эффект при более низких концентрациях наночастиц меди (1-10 мкг/мл).
3. Местное применение суспензии наночастиц меди превосходит эффективность лазерного воздействия, а при сочетании с НИЛИ позволяет ускорить купирование инфекционно-воспалительного процесса в ране на $6,2 \pm 0,5$ суток, появление грануляций и эпителизацию раны, которая отмечена к $11,8 \pm 1,0$ суткам лечения.
4. Экспериментально обоснована целесообразность сочетанного применения НИЛИ и суспензии наночастиц меди при хирургическом лечении инфицированных ожоговых ран кожи, что подтверждается сокращением сроков лечения экспериментальных животных на 21,8%

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для экспериментальной хирургии предложена запатентованная модель создания инфицированной ожоговой раны, при которой используется медная пластинка площадью 400 мм^2 и толщиной 1 мм. Через торец световода лазера («Лазермед 10 01») на нее контактно воздействуют излучением длиной волны 1064 нм в постоянном режиме, мощностью на торце световода 7,8-8,2 Вт. Под контролем тепловизора пластинка нагревается до 220°C , после чего выдерживается на коже ещё в течение 2 секунд. В результате создается ожоговая рана последовательно всех слоев кожи до подкожной клетчатки (ожог IIБ степени) площадью, соответствующей площади медной пластинки.
2. По результатам исследования рекомендуются для применения в экспериментальной хирургии инфицированных ожоговых ран кожи следующие критерии. Лечение лазером (НИЛИ) аппаратом АЛТ «Матрикс», тип МЛ01КР

(режимы: частота – 80 Гц, импульсная мощность излучения – 15 Вт, длина волны – 635 нм). Сеансы проводить через день по 2 минуты каждый в течение 14 дней.

3. Для практического использования в экспериментальной хирургии инфицированных ожоговых ран рекомендуется применять ультрадисперсный порошок меди, который состоит из её кластеров, включающих фрагменты от 60 до 80 нм, обладающих повышенной устойчивостью на воздухе. Суспензию наночастиц меди получали при соединении 0,8 мл стерильного подсолнечного масла с 1 мг наночастиц меди с конечной концентрацией 1 мкг/мл. Данное раневое покрытие наносить на поверхность инфицированной раны в указанной дозе ежедневно.

4. Согласно разработанной тактике лечения, после предварительного заключения о наличии инфицированной ожоговой раны, микробиологической и морфологической верификации показана хирургическая обработка раны (некрэктомия) с последующим сочетанным проведением НИЛИ и местным лечением суспензией наномеди в течение 14 суток послеоперационного периода. Полученные нами результаты обосновывают целесообразность проведения дальнейших экспериментов для практического внедрения в клиническую практику.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Добрейкин Е.А.**, Алипов Н.В. Способ местного лечения инфицированных ожоговых ран в эксперименте // Молодые ученые – здравоохранению: матер. 72-й межрегион. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых с междунар. участием. Ч. 2. Саратов: изд-во Саратов. мед. ун-та, 2011. С. 519-520.
2. Экспериментальное обоснование применения наночастиц меди и низкоинтенсивного лазерного излучения при лечении инфицированных ожоговых ран / Л.В. Рассказова, М.С. Лебедев, **Е.А. Добрейкин** [и др.] // Молодые ученые – здравоохранению: матер. 72-й межрегион. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых с междунар. участием. Ч. 2. Саратов: изд-во Саратов. мед. ун-та, 2011. С. 525-526.
3. Микробиологическая оценка результатов лечения инфицированных ожоговых ран кожи в эксперименте / П.А. Беляев, О.Г. Шаповал, М.С. Лебедев, **Е.А. Добрейкин** // Молодые ученые – здравоохранению: матер. 72-й

- межрегион. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых с междунар. участием. Саратов: изд-во Саратов. мед. ун-та, 2011. С. 242-243.
4. Инновационные нанотехнологии в экспериментальной хирургии / В.В. Алипов, М.С. Лебедев, **Е.А. Добрейкин** [и др.] // Междунар. журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2011. № 3. С. 84-86.
 5. **Опыт применения новых оригинальных мазей для лечения экспериментальной синегнойной инфекции ожоговых ран / Г.М. Шуб, В.В. Алипов, Е.А. Добрейкин [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. 2011. Т 7, № 2. С. 523-525.**
 6. **Экспериментальные лазерные нанохирургические технологии. Первые результаты и перспективы / В.В. Алипов, М.С. Лебедев, Е.А. Добрейкин [и др.] // Вест. экспериментальной и клинической хирургии. 2011. Т. 4, № 2. С. 330-333.**
 7. Инновационные нанотехнологии в экспериментальной хирургии / В.В. Алипов, М.С. Лебедев, **Е.А. Добрейкин** [и др.] // Междунар. журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2011. № 5. С. 85-86.
 8. Моделирование лазерных технологий в экспериментальной хирургии / В.В. Алипов, М.С. Лебедев, **Е.А. Добрейкин** [и др.] // Применение лазеров в медицине и биологии: матер. междунар. науч.-практ. конф. Харьков, 2011. С. 151-155.
 9. **Экспериментальное обоснование сочетанного применения мазей и электромагнитного излучения при лечении раневой инфекции / В.В. Алипов, Г.М. Шуб, Е.А. Добрейкин [и др.] // Проблемы физической биомедицины. 2011. С. 260-264.**
 10. **Алипов В.В., Лебедев М.С., Добрейкин Е.А. Лазерные нанотехнологии в экспериментальной хирургии // Рос. биотерапевтический журнал. 2011. № 4. С. 90.**
 11. Экспериментальное обоснование применения наночастиц меди и низкоинтенсивного лазерного излучения при лечении инфицированных ожоговых ран / В.В. Алипов, Л.В. Рассказова, **Е.А. Добрейкин** [и др.] // Новые технологии в экспериментальной и клинической хирургии: матер. межрегион. науч. конф. с междунар. участием. Саратов: Изд-во Саратов. мед. ун-та, 2011. С. 23-24.
 12. Экспериментальное обоснование применения наночастиц меди и низкоинтенсивного лазерного излучения при лечении инфицированных

- ожоговых ран/ В.В. Алипов, Л.В. Рассказова, **Е.А. Добрейкин** [и др.] // Бюллетень медицинских Интернет-конф. 2011. № 2. С. 57-58.
13. Алипов В.В., Лебедев М.С., **Добрейкин Е.А.** Лазерные нанотехнологии в экспериментальной хирургии // Актуальные проблемы современной науки: матер. VIII междунар. конф. Польша, 2012. Т. 36. С. 19-21.
- 14. Lazer nanotechnology in experimetal surgery / V.V. Alipov, H.M. Tstatsaev, E.A. Dobrejkin [et al.] // International Kongress «EuroMedica 2012». Hannover, 2012. Programm Abstracts P. 22-23.**
15. Алипов В.В., **Добрейкин Е.А.**, Урусова А.И. Экспериментальное обоснование применения наночастиц меди и низкоинтенсивного лазерного излучения при лечении инфицированных ожоговых ран // Современные наукоемкие технологии. 2012. № 12. С. 54-55.
16. Оценка сочетанного применения НИЛИ и наночастиц меди на ожоговую рану в эксперименте / В.В. Алипов, П.А. Беляев, **Е.А. Добрейкин**, А.И. Урусова // Современные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2012. Т. 2. С. 236-237.
17. Алипов В.В., **Добрейкин Е.А.**, Урусова А.И. Компьютерное и хирургическое 3D-моделирование ожоговой раны в эксперименте // Современные наукоемкие технологии. 2012. № 12. С. 56.
18. Алипов В.В., **Добрейкин Е.А.**, Урусова А.И. Результаты сочетанного применения наномеди и НИЛИ при облучении инфицированных ожоговых ран кожи в хирургическом эксперименте // Современные наукоемкие технологии. 2013. № 1. С. 56.
- 19. Оценка эффективности антимикробного действия НИЛИ, наночастиц меди и их сочетанного применения в эксперименте in vitro / В.В. Алипов, Е.А. Добрейкин, А.И. Урусова, П.А. Беляев // Вест. экспериментальной и клинической хирургии. 2013. № 2. С. 222-226.**
20. Алипов В.В., **Добрейкин Е.А.**, Урусова А.И. Лазерные технологии при моделировании инфицированной ожоговой раны кожи // Применение лазеров в медицине и биологии: матер. междунар. науч.-практ. конф. Харьков, 2013. С. 98-100.
21. Оценка сочетанного воздействия НИЛИ и наночастиц меди на инфицированную ожоговую рану в эксперименте / В.В. Алипов, **Е.А. Добрейкин**, А.И. Урусова, П.А. Беляев // Применение лазеров в медицине и биологии: матер. междунар. науч.-практ. конф. Харьков, 2013. С. 96-98.

22. **Добрейкин Е.А.** Экспериментальное обоснование способа моделирования ожоговой раны кожи у лабораторных животных // Саратовский научно-медицинский журнал. 2013. Т. 9, № 2. С. 205-208.
23. Экспериментальное обоснование применения лазерных и нанотехнологий в хирургии и онкологии / В.В. Алипов, Г.Е. Бриль, **Е.А. Добрейкин**, А.И. Урусова // Применение лазеров в медицине и биологии: матер. междунар. науч.-практ. конф. Ялта, 2013. С. 115-116.
24. **Результаты сочетанного применения наночастиц меди и НИЛИ при инфицированных ожоговых ранах кожи в хирургическом эксперименте / В.В. Алипов, Е.А. Добрейкин, А.И. Урусова, П.А. Беляев // Фундаментальные исследования. 2013. № 9. С. 272-275.**
25. **Экспериментальное обоснование сочетанного применения наночастиц меди и низкоинтенсивного лазерного облучения при хирургическом лечении моделированных инфицированных ожоговых ран кожи / В.В. Алипов, Е.А. Добрейкин, А.И. Урусова, П.А. Беляев // Вест. экспериментальной и клинической хирургии. 2013. № 4. С. 411-417.**
26. Алипов В.В., Урусова А.И., **Добрейкин Е.А.** Диагностика и лечение рака печени в эксперименте // II Всерос. науч. Интернет-конф. с междунар. участием. Казань, 2014. С. 16-18.
27. Алипов В.В., Урусова А.И., **Добрейкин Е.А.** Эффективность сочетанного применения наночастиц меди и низкоинтенсивного лазерного излучения на ожоговую рану в эксперименте // II Всерос. науч. Интернет-конф. с междунар. участием. Казань, 2014. С. 13-16.
28. Оценка сочетанного применения наночастиц меди и низкоинтенсивного лазерного излучения на инфицированную ожоговую рану в эксперименте / **Е.А. Добрейкин**, А.И. Урусова, П.А. Беляев [и др.] // Бюллетень медицинских Интернет-конф. 2014. Т. 4, № 5. С.846.
29. Лазерные технологии при моделировании инфицированной ожоговой раны кожи / **Е.А. Добрейкин**, А.И. Урусова, П.А. Беляев [и др.] // Бюллетень медицинских Интернет-конф. 2014. Т. 4, № 5. С. 847.
30. Лазерные нанотехнологии при инфекционных осложнениях экспериментальных опухолей / **Е.А. Добрейкин**, А.И. Урусова, П.А. Беляев [и др.] // Бюллетень медицинских Интернет-конф. 2014. Т. 4, № 5. С. 848.

31. Алипов В.В., Добрейкин Е.А., Урусова А.И. Оценка сочетанного применения наночастиц меди и НИЛИ при хирургическом лечении инфицированных ожоговых ран кожи в эксперименте // Вест. Рос. Военно-медицинской академии. 2014. №.3. С.140-144.
32. Добрейкин Е.А., Беляев П.А., Урусова А.И. Эффективность сочетанного применения наночастиц меди и НИЛИ на инфицированную ожоговую рану в эксперименте // Нанотехнология в теории и практике: матер. II Всерос. интернет-конф. Казань, 2014. С. 15-16.
33. Алипов В.В., Урусова А.И., Добрейкин Е.А. Экспериментальное обоснование способа лечения инфицированных ран // Сб. тр. международ. науч.-практ. конф. Тамбов, 2014. С. 7-8.
34. Evaluation of antimicrobial effect of copper nanoparticles' and low-intensity laser radiation and their combined application in experiment / V.V. Alipov, **E.A. Dobrejkin**, F.I. Urusova, P.A. Belaev //Westwood-Canada. 2014. P. 279-280.

Изобретения

35. Способ моделирования термической ожоговой раны кожи у лабораторных животных / Колсанов А.В., Алипов В.В., **Добрейкин Е.А.**: Патент РФ № 2472232. Оpubл.10.01.2013. Бюл. № 26.