

МОДИФИЦИРОВАННАЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ГНОЙНЫХ РАН (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Ю.В. Иванова

*д-р мед. наук, проф.
кафедра хирургии № 1
Харьковский национальный
медицинский университет
пр. Науки, 4, г. Харьков, 61022, Украина
тел.: +38 (067) 475-74-20
e-mail: yu.ivanova@ukr.net
ORCID 0000-0001-8773-6827*

И.А. Криворучко

*д-р. мед. наук, проф., заведующий кафедрой
кафедра хирургии № 2
Харьковский национальный медицинский
университет
пр. Независимости, 13, г. Харьков, 61022, Украина
тел.: +38 (057) 405-02-45
e-mail: dr.ivanova23@gmail.com
ORCID 0000-0002-5525-701X*

Абу Шабан ода Салех

*аспирант
Харьковская медицинская академия
последипломного образования
ул. Амосова, 51, г. Харьков, 61176, Украина
тел.: +38 (067) 475-74-20
e-mail: yu.ivanova@ukr.net
ORCID 0000-0002-4875-4181*

С.Н. Граматюк

*канд. мед. наук, директор
Институт клеточной биореабилитации
ул. Обоянская, 38а, г. Харьков, 61035, Украина
тел.: +38 (099) 154-91-44
e-mail: Gramatyuk@ukr.net
ORCID 0000-0003-4238-7031*

Е.В. Мушенко

*канд. мед. наук, старший научный сотрудник
отделение хирургии печени
и желчевыводящих путей
ГУ «Институт общей и неотложной хирургии
им. В.Т. Зайцева НАМН Украины»
въезд Балакирева, 1, г. Харьков, 61018, Украина
тел.: +38 (057) 341-49-50
e-mail: dr.mushenko@gmail.com
ORCID 0000-0003-0244-3289*

Введение. Широкое применение антибиотиков, оказывающих мутагенное действие на микрофлору, обуславливает изменение этиологической структуры гнойной инфекции, а также биологических свойств микробной клетки с появлением антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов. Следствием этого явилось снижение эффективности антибактериальной терапии, традиционно назначаемого местного лечения ран, а также растущая аллергия населения. Одним из перспективных методов борьбы с антибиотикорезистентностью микроорганизмов является антимикробная фотодинамическая терапия.

Цель. Экспериментальное исследование посвящено изучению результатов лечения гнойных ран в I фазе раневого процесса с использованием модифицированной фотодинамической терапии в зависимости от видовой принадлежности возбудителя.

Материалы и методы. Исследование проведено на 18 белых крысах-самцах линии Вистар, разделенных на три группы в зависимости от вида санации гнойных ран (по 6 животных в каждой серии). В контрольной группе лечение раны выполняли путем санации хлоргексидином, во второй опытной группе проводили сеансы фотодинамической терапии, в третьей опытной группе — фотосенсибилизатор модифицировали хитозаном. В динамике изучали микробную обсемененность ран, летальность животных, выполняли также гистологические и морфометрические исследования.

Результаты. В отношении грамотрицательных палочек использование в качестве фотосенсибилизатора «Фотолон» привело к существенному снижению бактериальной контаминации: в посевах число проросших колоний было меньше 10 бактерий/мл, что позволяет говорить об избирательности этого вида фотохимического воздействия в отношении грамотрицательной флоры.

Выводы. Модифицированная ФДТ оказалась эффективной в отношении грамотрицательных палочек (высеваемость уменьшилась с $3,70 \pm 0,05 \times 10^4$ (lg КОЕ/мл = 4,5682), до $2,90 \pm 0,05 \times 10^4$ (lg КОЕ/мл = 4,4623) и в отношении грамположительных возбудителей: число КОЕ/мл после второго сеанса было $< 1,0 \pm 0,05$ (lg КОЕ/мл = 1). Гистологическое и морфометрическое исследования показали преимущества модифицированной ФДТ по сравнению с традиционной обработкой гнойных ран.

Ключевые слова: гнойные раны, фотодинамическая терапия, хитозан, эксперимент.

MODIFIED PHOTODYNAMIC THERAPY OF PURULENT WOUNDS (EXPERIMENTAL STUDY)

Yu.V. Ivanova^{1,2,3}, S.N. Gramatiuk², I.A. Kryvoruchko¹,
E.V. Mushenko³, Abu Shaban Oda Salekh⁴

¹Kharkiv National Medical University
4, Nauky Av., Kharkiv, 61022, Ukraine

²Institute of Cell Biorehabilitation

38a, Oboyanskaya Str., Kharkiv, 61035, Ukraine

³SI "Zaycev V.T. Institute of General and Urgent Surgery of NAMS of Ukraine"

1, Balakirjeva entrance, Kharkiv, 61103, Ukraine

⁴Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education

51, Amosova Str., Kharkiv, 61176, Ukraine

E-mail: yu.ivanova@ukr.net

Introduction. The widespread use of antibiotics that have a mutagenic effect on the microflora causes a change in the etiological structure of purulent infection, as well as the biological properties of the microbial cell with the appearance of antibiotic-resistant strains of microorganisms. The consequence of this was a decrease in the effectiveness of antibiotic therapy, traditionally prescribed local treatment of wounds and amid growing allergization of the population. One of the promising methods of combating the antibiotic resistance of microorganisms is antimicrobial photodynamic therapy.

Purpose. An experimental study is devoted to studying the results of the treatment of purulent wounds in the first phase of the wound process using modified photodynamic therapy depending on the species of the pathogen.

Materials and methods. The study was conducted on 18 white Wistar male rats, divided into three groups depending on the type of sanation of purulent wounds (6 animals in each series). In the control group, wound treatment was performed by reorganization with chlorhexidine, in the second experimental group, photodynamic therapy sessions were performed, in the third experimental group, the photosensitizer was modified with chitosan. In dynamics, we studied the microbial contamination of wounds, the lethality of animals, and also performed histological and morphometric studies.

Results. With regard to gram-negative rods, the use of «Photolon» as a photosensitizer led to a significant reduction in bacterial contamination: in the crops, the number of germinated colonies was less than 10 bacteria/ml, which suggests the selectivity of this type of photochemical effect with respect to gram-negative flora.

Conclusions. Modified PDT was effective against gram-negative bacilli (plating decreased from $3.70 \pm 0.05 \times 10^4$ (log CFU/ml = 4.5682) to $2.90 \pm 0.05 \times 10^4$ (log CFU/ml = 4.4623) and with respect to gram-positive pathogens: the number of CFU/ml after the second session was $< 1.0 \pm 0.05$ (log CFU/ml = 1). Histological and morphometric studies showed the advantages of modified PDT compared to traditional treatment of purulent wounds.

Key words: purulent wounds, photodynamic therapy, chitosan, experiment.

МОДИФІКОВАНА ФОТОДИНАМІЧНА ТЕРАПІЯ ГНІЙНИХ РАН (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

Ю.В. Іванова^{1,2,3}, С.М. Граматюк², І.А. Криворучко¹,
Є.В. Мушенко³, Абу Шабан Ода Салех⁴

¹Харківський національний медичний університет
пр. Науки, 4, м. Харків, 61022, Україна

²Інститут клітинної біореабілітації

вул. Обоянська, 38а, м. Харків, 61035, Україна

³ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії імені В.Т.Зайцева НАМН України»

в'їзд Балакірева, 1, м. Харків, 61018, Україна

⁴Харківська медична академія післядипломної освіти

вул. Амосова, 51, м. Харків, 61176, Україна

E-mail: yu.ivanova@ukr.net

Вступ. Широке застосування антибіотиків, що чинять мутагенну дію на мікрофлору, обумовлює зміну етіологічної структури гнійної інфекції, а також біологічних властивостей мікробної клітини з появою антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів. Наслідком цього стало зниження ефективності антибактеріальної терапії, традиційного місцевого лікування ран, а також зростаюча алергізація населення. Одним з перспективних методів боротьби з антибіотикорезистентністю мікроорганізмів є антимікробна фотодинамічна терапія.

Мета. Експеримент був присвячений вивченню результатів лікування гнійних ран у I фазі ранового процесу з використанням модифікованої фотодинамічної терапії в залежності від видової приналежності збудника.

Матеріали та методи. Дослідження проведено на 18 білих щурах-самцях лінії Вістар, яких було розподілено на три групи в залежності від способу санації гнійних ран (по 6 тварин в кожній серії). В контрольній групі лікування ран виконували шляхом санації хлоргексидином, в другій дослідній проводили сеанси фотодинамічної терапії, в третій дослідній групі — фотосенсибілізатор модифікували хітозаном. Вивчали мікробну забрудненість ран, летальність тварин, виконували також гістологічні і морфометричні дослідження.

Результати. По відношенню до грамнегативних паличок використання в якості фотосенсибілізатора «Фотолон» привело до суттєвого зниження бактеріальної контамінації: кількість колоній була менше, ніж 10 бактерій/мл, що дозволяє припустити вибірковість цього виду фотохімічного впливу у відношенні грамнегативної флори.

Висновки. Модифікована ФДТ виявилась ефективною по відношенню до грамнегативних паличок (кількість зменшилась з $3,70 \pm 0,05 \times 10^4$ (lg КОЕ/мл = 4,5682), до $2,90 \pm 0,05 \times 10^4$ (lg КОЕ/мл = 4,4623) та у відношенні до грампозитивних збудників: число КОЕ/мл після другого сеансу було $< 1,0 \pm 0,05$ (lg КОЕ/мл = 1). Гістологічне та морфометричне дослідження показали переваги модифікованої ФДТ у порівнянні з традиційною із традиційною обробкою гнійних ран.

Ключові слова: гнійні рани, фотодинамічна терапія, хітозан, експеримент.

Введение

Введение. Лечение гнойных ран является наиболее древней, но не потерявшей до настоящего времени актуальности, проблемой хирургических клиник [1,2]. Широкое применение антибиотиков, оказывающих мутагенное действие на микрофлору, обуславливает изменение этиологической структуры гнойной инфекции, а также биологических свойств микробной клетки с появлением антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов [2-4]. Следствием этого явилось снижение эффективности антибактериальной терапии и традиционно назначаемого местного лечения ран на фоне растущей алергизации населения, а также иммунобиологической резистентности макроорганизма [5]. Указанные факторы определяют ухудшение результатов лечения больных хирургического профиля за счет возрастания сроков лечения и количества неблагоприятных исходов. Быстрая приспособляемость бактерий, отсутствие принципиально новых классов антибиотиков, трудности в разработке новых медикаментозных методов предотвращения антибиотикорезистентности требуют поиска и внедрения иных методов борьбы с антибиотикорезистентными штаммами микроорганизмов, в т. ч. физических. Одним из таких методов является фотодинамическая терапия (ФДТ), в основе которой лежит светоиндуцированная химиотерапия, которая подразумевает обязательное наличие трех факторов: двух экзогенных (фотосенсибилизатора (ФС)) и света), а также одного эндогенного — кислорода [6,7].

В последние десятилетия хитин и хитозан интенсивно применяют в медицине, ветеринарии, косметологии, сельском хозяйстве, пищевой промышленности, биотехнологии. Хитозан обладает хорошей биосовместимостью с тканями живых организмов, биодegradуемостью, неиммуногенными и выраженными сорбционными свойствами и практически нетоксичен [8]. Хитин и его производные применяют при лечении таких тяжелых

воспалительных заболеваний органов брюшной полости, как разлитой гнойный перитонит и деструктивная форма острого панкреатита [9]. На основе хитина и хитозана разработаны детоксицирующие сорбенты: в гранулярной и гелевой форме они обеспечивают высокую химическую и биологическую активность полимера, достаточную проницаемость и высокую гидрофильность. Хитозан обладает бактериостатическими свойствами, агглютинирует микроорганизмы [10], стимулирует функциональную активность макрофагов, индуцирует секрецию арахидоновой кислоты посредством активации фосфолипазы А2, а также увеличивает выделение медиаторов иммунного ответа, в частности, интерлейкина 1, стимулирующего пролиферацию Т-хелперов, а также активность гранулоцитов, преимущественно нейтрофилов. Фагоцитируемые частицы хитина и хитозана усиливают образование активных форм кислорода в альвеолярных макрофагах [11].

Предварительные результаты апробации разработанных раневых покрытий на основе коллаген-хитозанового соединения показали, что данная композиция способна полностью восстанавливать плоскостные дефекты, стимулирует регенерацию тканей [12]. Выявлена антисептическая активность хитозана по отношению к наиболее часто встречающимся возбудителям гнойных осложнений [13]. И хотя по силе антимикробного действия он уступает антибиотикам, при контакте с микробной флорой в жидкой среде сохраняет бактериостатическую активность в течение 2–2,5 суток. Показано, что губки на хитозан-коллагеновой полимерной основе обладают бактериостатической активностью по отношению *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* [14]. Работами исследователей показано, что продукты глубокого гидролиза хитозана (олигомеры) и высокомолекулярные фракции (350 кДа) не биоцидны к патогенной флоре, либо слабо биоцидны [15], однако, фракции с низкой молекулярной массой (ММ) 16–20 кДа являются сильными биоцидами

широкого спектра действия, что было подтверждено при использовании крабового и пчелиного низкомолекулярного хитозана с ММ от 4 кДа до 27 кДа. Кроме того, *C. albicans* чувствительна ко всем крабовым хитозанам с ММ 5 кДа, 6 кДа, 12 кДа, 27 кДа и к пчелиному хитозану с ММ 15 кДа, 7 кДа, что позволяет рекомендовать их при кандидозной инфекции [16]. Таким образом, применение хитозана в лечении гнойных ран представляется перспективным и нуждается в дальнейшей разработке.

Цель исследования — уточнение показаний и модификация методики фотодинамической терапии гнойных ран в эксперименте с целью повышения бактерицидного эффекта фотосенсибилизатора и ускорения процессов регенерации.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 18 белых крысах-самцах линии Вистар массой 220–300 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с Европейской конвенцией (Страсбург, 1986 г.) и Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (2000 г.), Директивой Совета Европейского Содружества от 24.11.86 г. и распоряжением МОЗ Украины №32 от 22.02.88 г.

В качестве экспериментальной модели использована модель полнослойной плоскостной раны (Л.И.Слущкий, 1969, А.В.Shekhteret al., 2005), которую наносили в условиях общего обезболивания (кетамин из расчета 12,5 мг/100 г. массы тела животного внутримышечно). У всех исследуемых животных моделированы раны стандартного размера (площадью $\approx 300 \text{ мм}^2$).

В эксперименте изучали антибактериальную эффективность модифицированного комплекса «Фотолон» для ФДТ в отношении патогенной флоры различной групповой принадлежности. Для инфицирования ран использовали взвесь суточной ассоциированной микробной культуры, содержащую 10^6 микробных тел в 1 мл жидкой культуры. В ассоциации в равновесном соотношении содержались патогенные возбудители различной групповой принадлежности: грамположительные бактерии — *Staphylococcus aureus* S7 (клинический штамм); грамотрицательные палочки — *Escherichia coli* ATCC 8739 (музейный штамм); *Pseudomonas aeruginosa* (музейный штамм, в 1 мл взвеси — 10^8 КОЕ). В зависимости от вида обра-

ботки, используемой для лечения ран, выполнено три серии экспериментов по 6 животных в каждой (табл. 1).

Через сутки после моделирования инфицированной раны в группах II и III начинали сеансы фотодинамической терапии (ФДТ).

В качестве фотосенсибилизатора (ФС) использовали Фотолон (Photolon, Fotolon) («Белмедпрепараты», Республика Беларусь). В качестве модификатора фотосенсибилизатора использовался хитозан — природный полисахарид, продукт частичного дезацетилирования хитина. В экспериментальном исследовании хитозан использовали в виде пленок, содержащих хитозан и гидроксипатит (4:1) (г. Сумы).

Методика ФДТ. В условиях общего обезболивания с поверхности удаляли экссудат, после чего на раневую поверхность наносили раствор ФС в количестве 1,5 мл (у животных II группы), у крыс III группы после нанесения ФС рану укрывали пленкой с хитозаном. После аппликации ФС раневую поверхность накрывали салфеткой и животных помещали в темный бокс. Через 15 мин начинали фотообработку ран после снятия пленки.

Сеансы ФДТ ран проводили с использованием в качестве источника излучения фотонные матрицы А.М.Коробова с длиной волны излучения 661 нм и выходной мощностью 0,12 Вт, плотностью мощности 1 Вт/см² и плотностью энергии 30 Дж/см². На 4-е сутки после моделирования раневого дефекта и его инфицирования (следующие сутки после последнего сеанса ФДТ) животных выводили из эксперимента путем передозировки тиопентал-натрия и выполняли забор материала для гистологического исследования.

В динамике оценивали общее состояние животных, макроскопические характеристики ран и летальность.

Микробиологическое исследование проводили в дни сеансов ФДТ (на 1-е и 3-и сутки после моделирования инфицированной раны). Перед проведением облучения из каждой раны были взяты мазки с целью определения исходной микробной обсемененности. Изучали количественный и качественный состав микрофлоры по методике E.D. Rotheram. Количественно бактериальную обсемененность (с учетом разведений и объема высеваемого смыва) оценивали числом колониеобразующих единиц в 1,0 мл смыва (КОЕ/мл). Статистическую обработку параметрических данных

Таблица 1

Группы экспериментальных животных

№ группы	Вид воздействия
I (контрольная) (n=6)	Обработка ран раствором хлоргексидина
II (n=6)	Водный раствор «Фотолон» + ФД-активация
III (n=6)	Комплекс «Фотолон» + хитозан + ФД-активация

проводили с помощью парного критерия Стьюдента к логарифмированным значениям КОЕ/мл. Колонии разных морфологических типов исследовали с помощью световой микроскопии мазков, окрашенных по Граму. Определение микробной обсемененности производилось дважды на каждом этапе исследования: до начала лечения, после проведения первого сеанса ФДТ, перед проведением второго и по окончании второго сеанса.

Полученные микропрепараты изучали с использованием светового микроскопа Olympus BX51 (Olympus, Япония).

Статистический анализ проводили с использованием стандартного пакета программ SPSS for Windows 13.0.

Результаты и обсуждение

Через сутки после моделирования инфицированных ран общее состояние всех животных можно было оценить как среднетяжелое: крысы вялые, малоподвижные, у части из них отмечались сукровичные выделения из носа.

Раны у всех животных имели признаки нагноения: на раневой поверхности отмечалось скопление жидкого фибринозно-геморрагического экссудата, у части животных экссудат отсутствовал. Дно раны по всей поверхности было выполнено тонким слоем фибрина, утолщающегося у ее краев. Подлежащие ткани были отечны и имели синюшный оттенок. Перифокальная реакция была выражена

умеренно: кожные края незначительно отечны, плотная инфильтрация не наблюдалась, гиперемия незначительна.

В первые сутки эксперимента в двух опытных группах (II–III) был проведен 1-й сеанс ФДТ, а в группе I раны обработаны раствором хлоргексидина. Во всех группах у каждого животного брали мазки раневого отделяемого для микробиологического исследования. Обращало на себя внимание, что в процессе фотоактивации у некоторых животных в мягких тканях на дне ран появлялись очаги петехиальных кровоизлияний, в большей степени выраженное у крыс II группы (в 3 наблюдениях). В эти сроки умерло одно животное этой группы. У животных III группы подобное явление наблюдалось у одной крысы (единичные мелкоочечные петехии).

На следующие сутки после первого сеанса ФДТ (2-е сутки после моделирования) у животных группы I (контрольной) отмечалось ухудшение общего состояния (крыса вяла, адинамична, отказывается от корма), пала одна крыса.

На 3-и сутки общее состояние животных II и III групп можно было оценивать как удовлетворительное: они стали более активными, принимали пищу. Лишь у 1 крысы II группы сохранялись выделения из носа. В I (контрольной) группе общее состояние животных оставалось среднетяжелым. Пала еще одна крыса, у которой отмечались проявления диареи.

Таблица 2

Бактериальная обсемененность ран в процессе местного лечения

Срок исследования	Группы животных	Сроки	Стафилококки		Грамотрицательные палочки	
			КОЕ/мл ($M \pm m$)	Ig КОЕ/мл	КОЕ/мл $\times 10^6$ ($M \pm m$)	Ig КОЕ/мл
Через 24 часа после моделирования	I	До обработки	$3,10 \pm 0,05 \times 10^6$	6,4913	$5,00 \pm 0,05 \times 10^6$	6,6989
		После обработки	$3,00 \pm 0,05 \times 10^6$	6,4771	$4,20 \pm 0,05 \times 10^4$	4,6232
	II	До обработки	$3,10 \pm 0,05 \times 10^6$	6,4913	$5,00 \pm 0,05 \times 10^6$	6,6989
		После обработки	$2,40 \pm 0,05 \times 10^3$	3,3802	$<1,0 \pm 0,05 \times 10$	1
	III	До обработки	$3,00 \pm 0,05 \times 10^6$	6,5185	$2,80 \pm 0,05 \times 10^6$	6,4471
		После обработки	$4,3 \pm 0,05 \times 10^4$	4,6384	$3,20 \pm 0,05 \times 10^4$	4,5051
Через 72 часа после моделирования	I	До обработки	$5,00 \pm 0,05 \times 10^3$	3,6989	$3,9 \pm 0,05 \times 10^3$	3,544
		После обработки	$3,00 \pm 0,05 \times 10^3$	3,4771	$3,7 \pm 0,05 \times 10^3$	3,5682
	II	До обработки	$3,60 \pm 0,05 \times 10^3$	4,5563	$3,50 \pm 0,05 \times 10^3$	3,544
		После обработки	$4,2 \pm 0,05 \times 10^3$	3,6232	$<1,0 \pm 0,05 \times 10$	1
	III	До обработки	$3,30 \pm 0,05 \times 10^4$	4,5185	$3,70 \pm 0,05 \times 10^4$	4,5682
		После обработки	$<1,0 \pm 0,05 \times 10$	1	$2,90 \pm 0,05 \times 10^4$	4,4623

В эти сроки стали заметными и местные различия в состоянии ран. У животных II и III групп уменьшилась экссудация. Среди животных III группы лишь у 3 крыс на поверхности раны жидкий мутноватый серозный экссудат присутствовал в небольшом количестве (около 0,5 мл), а дно ран было выполнено слоем фибрина, более толстого и рыхлого по краям раны. У большинства крыс отечность кожных краев ран заметно уменьшалась, гиперемия исчезла. В I (контрольной) группе во всех ранах еще присутствовал экссудат в достаточном количестве (более 0,5 мл), при этом у 2 животных он имел явно гнойный характер: был мутный слизеобразный, с неприятным запахом; у 3 остальных экссудат был более жидкий, фибринозно-геморрагический. Отечность кожи вокруг ран несколько увеличилась.

В эти сроки во II и III группах был проведен 2-й сеанс ФДТ, в контрольной группе раны также обрабатывались раствором хлоргексидина.

На 4-е сутки после индукции патологического процесса и 2 сеансов ФДТ общее состояние животных II и III групп заметно улучшилось. В этот срок животные были выведены из эксперимента.

Следует отметить факт достаточно высокого уровня летальности (16,7%) во II группе крыс, что по-видимому, обусловлено сочетанием токсического влияния инфекции с фотоцитотоксической активностью «Фотолона». В III группе выжили все животные, что может свидетельствовать о снижении фототоксичности ФС за счет его комбинации с хитозаном.

При изучении микробной обсемененности ран до начала лечения в каждой экспериментальной группе было установлено, что концентрация *St. aureus* в среднем составила $(3,25 \pm 0,05) \times 10^6$ КОЕ, а *E. coli* и *Ps. aeruginosa* — $(4,20 \pm 0,05) \times 10^6$ КОЕ.

Количественные показатели микробной обсемененности ран представлены в табл. 2.

Приведенные в табл. 2 данные свидетельствуют, что через 24 часа после моделирования перед 1-м сеансом ФДТ начальная контаминация ран во всех группах животных была одинаковой и составила для кокковой флоры: $(3,00 \pm 0,05) \times 10^6$ – $(3,80 \pm 0,05) \times 10^6$ и для грамотрицательных палочек $(2,80 \pm 0,05) \times 10^6$ – $(5,00 \pm 0,05) \times 10^6$ КОЕ/мл.

В контрольной группе первичная обработка ран раствором хлоргексидина привела к снижению числа грамотрицательных палочек до $(4,20 \pm 0,05) \times 10^4$ КОЕ/мл, но существенно не повлияла на присутствие стафилококков. Повторная обработка ран хлоргексидином также не привела к снижению уровня контаминации как кокковой, так и грамотрицательной флоры по сравнению с исходным (до начала 2-й обработки) уровнем. Следует отметить уровень летальности в этой группе — 33,3% (умерли 2 крысы).

Во II группе после 1-го сеанса ФДТ обсемененность стафилококками снизилась в 1,5 раза. В отно-

шении грамотрицательных палочек использование в качестве фотосенсибилизатора «Фотолона» привело к существенному снижению бактериальной контаминации: в посевах число проросших колоний было меньше 10 бактерий/мл. Те же данные получены и после 2-го сеанса ФДТ с «Фотолоном», что позволяет говорить об избирательности этого вида фотохимического воздействия в отношении грамотрицательной флоры.

В ходе проведенного эксперимента нами была обнаружена избирательная антимикробная активность комбинации «Фотолон»–хитозан (III группа) в отношении грамположительных бактерий. При сравнении уровня общей обсемененности ран с помощью парного критерия Стьюдента к логарифмированным значениям КОЕ/мл (\lg КОЕ/мл) было получено достоверное снижение бактериальной обсемененности ран в группе III: после 2-го сеанса ФДТ кокковая флора с поверхности ран практически не высевалась: число КОЕ/мл было $< 1,0 \pm 0,05$ (\lg КОЕ/мл = 1). Высеваемость грамотрицательных палочек уменьшилась в 1,7 раза: до обработки число КОЕ/мл до обработки составляло $3,70 \pm 0,05 \times 10^4$ (\lg КОЕ/мл = 4,5682), после обработки — $2,90 \pm 0,05 \times 10^4$ (\lg КОЕ/мл = 4,4623) соответственно. Возможно, обнаруженная эффективность комбинации «Фотолон»–хитозан обусловлена повышенной фотогенерацией синглетного кислорода при иммобилизации комплексов фотосенсибилизатора на хитозане.

При гистологическом исследовании препаратов, полученных у крыс контрольной группы, установлено, что дно раны было выстлано фибринозно-лейкоцитарным слоем, содержащим нейтрофилы и лимфоциты, а также включения некротического детрита. У части животных слой экссудата был сравнительно толстым с многочисленными крупными колониями микроорганизмов, под которыми обнаруживалась грануляционная ткань незрелого характера.

У животных II группы раневая поверхность была покрыта фибринозно-лейкоцитарным слоем, под которым визуализировался слой геморрагического экссудата с большим количеством эритроцитов. Еще глубже располагалась незрелая грануляционная ткань, состоящая из новообразованных капилляров и беспорядочно расположенных фибробластов. В ней в большом количестве содержались нейтрофилы, лимфоциты и макрофаги, а также скопления эритроцитов (рис. 1).

Отмечалась также выраженная воспалительная инфильтрация с большим количеством распадающихся нейтрофилов и частичным некрозом мышечных волокон.

В препаратах, полученных у крыс III группы во всех наблюдениях на раневой поверхности был виден относительно широкий фибринозно-лейкоцитарный слой, состоящий из рыхлого фибрина,

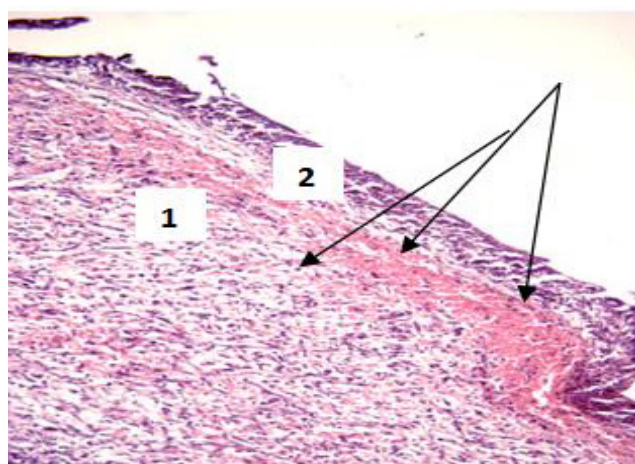


Рис. 1. Группа II. Незрелая грануляционная ткань (1), покрытая фибринозно-лейкоцитарным слоем (2). Между ними – скопления эритроцитов; окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

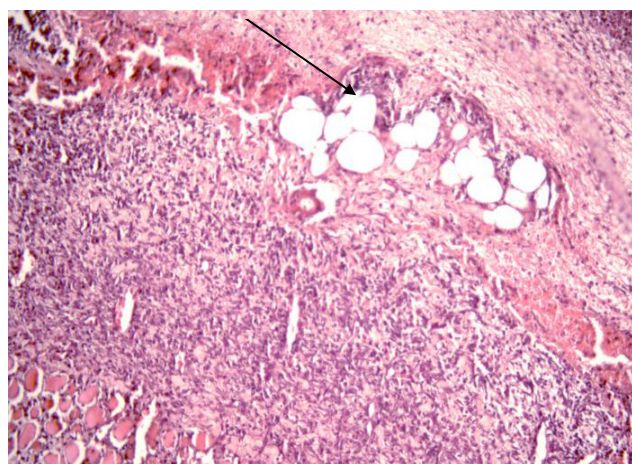


Рис. 2. Группа III. Часть фибринозно-лейкоцитарного слоя, под ним – островок жировой ткани и широкий слой относительно зрелой грануляционной ткани; окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 200$

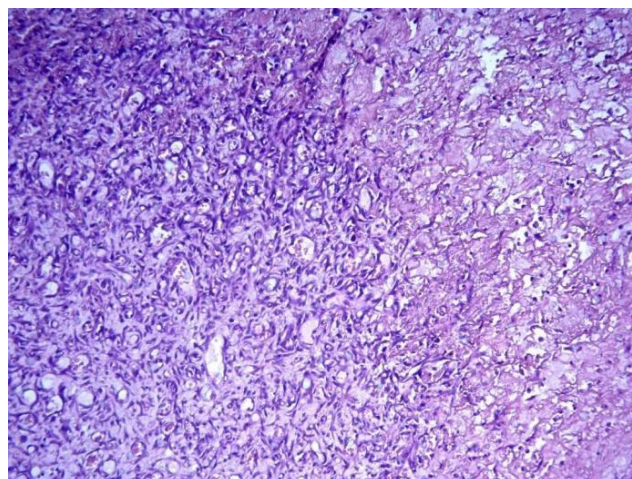


Рис. 3. Группа III. Выраженный рост грануляционной ткани с пролиферацией фибробластов и усиленным неоангиогенезом; окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 200$

нейтрофилов (частично разрушенных) и лимфоцитов, но в отличие от вышеописанных групп, слой фибринозно-лейкоцитарного экссудата не имел геморрагического характера.

Располагающийся ниже слой грануляционной ткани занимал всю раневую поверхность и был шире, чем во всех остальных группах. Сама грануляционная ткань отличалась зрелостью, в ней преобладали фибробласты, хотя оставалась еще лимфо-макрофагальная инфильтрация с очень небольшой примесью нейтрофильных лейкоцитов (рис. 2). Часть капилляров приобретала вертикальную ориентацию (рис. 3).

Морфометрическое исследование показало, что на фоне лечения ран раствором хлоргексидина, толщина слоя грануляционной ткани была наименьшей ($79,5 \pm 44,4$ мкм). При этом во всех остальных группах толщина грануляционной ткани была статистически значимо больше, чем в группе I. В группе III слой грануляционной ткани был статистически значимо толще, чем во всех остальных группах.

Таким образом, отличительной особенностью III группы наблюдений является отсутствие геморрагических проявлений, наименьшая выраженность воспалительных изменений, в том числе – микроциркуляторных нарушений. Степень регенерации (созревание грануляционной ткани) также выражена сильнее, чем в I и II группах.

Используемая для моделирования гнойных ран комбинация патогенов оказалась высоковирулентной. При этом в развитии патологического инфекционного процесса доминировало общетоксическое действие, а местные проявления были выражены слабее. Лишь в 2 случаях у животных контрольной группы к 3-м суткам наблюдений раны имели признаки типичного гнойного воспаления: наличие фибринозно-гнойного экссудата с неприятным запахом, раневого детрита, перифокального отека. Сеансы ФДТ способствовали улучшению как общего состояния, так и местного процесса у животных групп II и III. Следует отметить, что у животных групп II экссудат имел выраженный геморрагический характер. В группе III геморрагический компонент был выражен весьма незначительно либо отсутствовал.

Летальность в группе II составила 16,6%, в III группе – 0.

В ходе проведенного эксперимента нами была обнаружена избирательная антимикробная активность комбинации «Фотолон»-хитозан в отношении грамположительных бактерий, а водного раствора ФС «Фотолон» – в отношении грамотрицательных бактерий.

Гистологическое изучение биоптатов тканей ран проводилось на 4-е сутки после моделирования гнойных ран, поскольку в этот срок I (воспалительная) фаза раневого процесса переходит во

II (пролиферативную) фазу. Именно в эти сроки определяется дальнейший темп заживления, заканчивающегося полной эпителизацией ран [6].

В проведенном исследовании гистологическое изучение показало, что при обработке инфицированных ран раствором хлоргексидина в тканях дна раны, представленных жировой, мышечной тканями и островками начинающейся развиваться грануляционной ткани, преобладали воспалительная инфильтрация, отек и микроциркуляторные нарушения. В слое фибринозно-лейкоцитарного экссудата обнаруживались колонии кокковой микрофлоры. Наряду с данными макроскопической клинической картины и результатами микробиологических исследований это свидетельствует о недостаточности антибактериального воздействия данной обработки, пролонгации I фазы раневого процесса и торможении дальнейшего течения репаративно-регенераторных процессов.

В группе II грануляционная ткань занимала уже большее пространство, в ней более выражены неоангиогенез и пролиферация фибробластов, однако ткань имела незрелый характер. Воспалительные изменения в ней, а также в подлежащей жировой и мышечной тканях выражены еще достаточно сильно. Следует подчеркнуть также геморрагический характер экссудата и наличие диапедезных кровоизлияний в тканях. Подобные явления, связанные с увеличением проницаемости сосудов под влиянием «Фотолон», соответствуют литературным данным [7, 8].

В группе III, где в качестве фотосенсибилизатора использована комбинация «Фотолон»–хитозан, гистологическое изучение в совокупности с данными микробиологических исследований подтвердило и объективизировало результаты клинических наблюдений о наиболее благоприятном течении раневого процесса. Наряду с отсутствием геморрагических проявлений наблюдалась наибольшая степень снижения воспалительной реакции с одновременным усилением регенераторно-репаративных признаков (рост и созревание грануляционной ткани, неоангиогенез и коллагеногенез). Это нашло подтверждение и при анализе такого важного морфологического показателя, как толщина слоя грануляционной ткани при ее морфометрии.

Выводы

По нашему мнению, хитозан в комплексе с «Фотолоном» в условиях фотоактивации усиливает антибактериальный, противовоспалительный и регенераторный эффекты. Тем самым открывается возможность перспективного использования этого комплекса для антибактериальной ФДТ как нового метода лечения инфекционно-воспалительных заболеваний кожи и мягких тканей.

Литература

1. Блатун ЛА. Местное медикаментозное лечение ран. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2011;4:51–9.
2. Колсанов АВ и др. Оценка эффективности применения раневых покрытий при лечении ран и раневой инфекции кожи и мягких тканей. Морфологические ведомости. 2011;2(33):146.
3. Кузина МИ, Костюченка БМ. Раны и раневая инфекции. Москва: Книга по требованию; 2012. 592 с.
4. Лигоненко АВ и др. Прогнозирование течения заживления гнойных ран. Хирургия. 2011;2(38):60-4.
5. Davies CE, Wilson MJ, Harding KG, et al. Use of molecular techniques to study microbial diversity in the skin: Chronic wounds reevaluated. Wound Repairation and Regeneration 2011;9:332-40.
6. Странадко ЕФ. Опыт фотодинамической терапии с фотосенсибилизаторами хлороинового ряда. Лазерная медицина. 2016;19(1):75-81.
7. Шилягина НЮ, Плеханов ВИ, Шкунов ИВ, Шилягин ПА и др. Светодиодный излучатель для исследования in vitro световой активности препаратов для фотодинамической терапии. Современные технологии в медицине. 2014;2:15-24.
8. Dai T, Gupta A, Huang YY, Sherwood ME, Murray CK, et al. Blue light eliminates community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in infected mouse skin abrasion. Photomedicine and Laser Surgery. 2013;2:531–8.

References

1. Blatun LA. [Local drug treatment of wounds]. Surgery. Hirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova [Surgery.Journal named after Pirogov]. 2011;4:51–9. (in Russian)
2. Kolsanov AV, et al. [Evaluation of the effectiveness of wound dressings in the treatment of wounds and wound infections of the skin and soft tissues]. Morfologicheskie vedomosti [Morphological statements]. 2011;2(33):146. (in Russian)
3. Kuzina MI, Kostyuchenka BM. Rany i ranevaya infekcii [Wounds and wound infections]. Moscow: Kniga po trebovaniyu Publ.; 2012. 592 p. (in Russian)
4. Ligonenko AV, et al. [Prediction of the course of healing of purulent wounds]. Hirurgiya [Surgery]. 2011;2(38):60-4. (in Russian)
5. Davies CE, Wilson MJ, Harding KG, et al. Use of molecular techniques to study microbial diversity in the skin: Chronic wounds reevaluated. Wound Repairation and Regeneration 2011;9:332-40.
6. Stranadko EF. [Experience in photodynamic therapy with chlorin photosensitizers]. Lazernaya medicina [Laser medicine]. 2016;19(1):75-81. (in Russian)
7. Shilyagina NYu, Plekhanov VI, Shkunov IV, Shilyagin PA, et al. [LED emitter for in vitro studies of the light activity of drugs for photodynamic therapy]. Sovremennye tekhnologii v medicine [Modern technologies in medicine]. 2014;2:15-24. (in Russian)
8. Dai T, Gupta A, Huang YY, Sherwood ME, Murray CK, et al. Blue light eliminates community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in infected mouse skin abrasion. Photomedicine and Laser Surgery. 2013;2:531–8.