

## **ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЧЕТАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ И НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ИНФИЦИРОВАННЫХ ОЖГОВЫХ РАН КОЖИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

**Добрейкин А.Е., Урусова А.И., Андреев Д.И., Кондраков А.А., Кадышев А.В., Рудакова А.В., Ушакова В.В., Чехонацкий В.А., Чехонацкий И.А.**

*ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского Минздрава России», Саратов, Россия (410012, Саратов, ул. Большая Казачья, 112), e-mail: dr\_dea@mail.ru*

Целью работы была разработка способа моделирования инфицированных ожоговых ран кожи и экспериментальное обоснование *in vivo* эффективности сочетанного применения наночастиц меди и низкоинтенсивного лазерного излучения для лечения инфицированных ожоговых ран кожи. Материал и методы. В эксперименте на 150 белых лабораторных крысах массой 190–200 г. разработан и запатентован способ моделирования ожоговой раны кожи. Результаты. Сочетанное местное применение лазерного излучения и наночастиц меди у экспериментальных животных с инфицированными ожогами кожи к 7-м суткам обеспечивало прекращение высеваемости патогенной микрофлоры, появление к 4-м суткам лечения грануляций, а к 14-м суткам – эпителизацию раны. Заключение. Сочетанное применение лазерного излучения и наночастиц меди позволяет получать антибактериальный эффект при более низких концентрациях наночастиц меди, снижая тем самым возможное токсическое действие данного вещества на организм, снижает сроки полноценной эпителизации раны по сравнению со стандартными способами лечения.

Ключевые слова: ожоги, эксперимент, моделирование, наночастицы меди, низкоинтенсивное лазерное излучение, антимикробная активность, сочетанное лечение.

## **EFFECT OF COMBINED COPPER NANOPARTICLES' AND LOW-INTENSITY LASER RADIATION APPLICATION IN SURGICAL TREATMENT INFECTED BURN WOUNDS OF THE SKIN IN EXPERIMENTS**

**Dobrejkin E.A., Urusova A.I., Andreev D.I., Condracov A.A., Cadishev A.V., Rudacova A.V., Ushacova V.V., Cyechonacki V.A., Cyechonacki I.A.**

*Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Saratov, Russia (410012, Saratov, street B. Kazachya, 112), e-mail: dr\_dea@mail.ru*

The aim of the study was to study the markedness of copper nanoparticles' and low-intensity laser radiation, antimicrobial action and to evaluate the effectiveness of their combined application *in vitro* and *in vivo* experiment. Materials and methods. On the basis of the experiment on 150 white laboratory rats of 190–200g. weight there was developed and patented the method of skin burn wound simulation; the effect of copper nanoparticles' and low-intensity laser radiation combined application in the treatment of infected burn wounds was studied in the experiment on similar animals. Results. Combined local application of lazer radiation and copper nanoparticles in experimental animals of the group under observation provided by the 7<sup>th</sup> day of treatment discontinuation of pathogenic microflora inoculation, by the 4<sup>th</sup> day – appearance of granulations, and by the 14<sup>th</sup> day of treatment-wound epithelization. Conclusion. The obtained findings of experimental studies with the use of planimetric and microbiological methods of investigation suggest rather high efficiency of combined application of copper nanoparticles and laser radiation, the effect surpassing that of standard methods of treatment in duration and adequacy of wound epithelization.

Keywords: burns, experimental simulation, copper nanoparticles, low-intensity laser radiation, combined application.

Одним из актуальных и перспективных направлений в современной экспериментальной медицине считается применение лазерных и нанотехнологий [6,7]. Среди множества современных способов моделирования ожоговой раны кожи лучшим представляется использование высокоинтенсивного лазера, что позволяет быстро воспроизвести ожоговую рану точно заданной площади и глубины поражения кожи

экспериментального животного [4,5]. В литературе имеются единичные сообщения о применении низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) и наночастиц в экспериментальной хирургии [1]. Использование НИЛИ при лечении гнойных ран обеспечивает антимикробное воздействие, стимулирует регенераторные процессы, улучшает микроциркуляцию [2]. Подобные данные получены иностранными авторами: применение НИЛИ способствует более быстрому очищению ран от гнойно-некротических масс, раннему образованию грануляций, эпителизации раневых дефектов и сокращению сроков лечения [8,9]. За последнее пятилетие работами иностранных и отечественных ученых установлено, что наночастицы меди проявляют ярко выраженную биологическую активность, в том числе бактериостатическое и бактерицидное действие, причем это действие пролонгировано и менее токсично по сравнению с солями меди [3]. Наибольшим антимикробным влиянием на грамотрицательные микроорганизмы обладает суспензия наночастиц меди при концентрации 1 мг/мл. Более высокие концентрации наночастиц токсичны и представляют потенциальную опасность для организма [7]. Доказано ранозаживляющее действие синтезированного ультрадисперстного порошка меди, который в отличие от антибиотиков не вызывает селекции резистентных штаммов, что позволяет в дальнейшем рекомендовать его для использования при лечении гнойных заболеваний, вызванных полиантибиотикорезистентными штаммами [3]. Таким образом, актуальным направлением в хирургии при лечении ожогов кожи является экспериментальное обоснование эффективности применения наночастиц металлов, поиск усиления их бактерицидного действия при инфицированных ожогах кожи, в том числе в сочетании с низкоинтенсивным лазерным воздействием на рану.

**Цель исследования** – в экспериментах на лабораторных крысах обосновать эффективность сочетанного применения наночастиц меди и низкоинтенсивного лазерного облучения для лечения инфицированных ожоговых ран кожи.

**Материал и методы.** В ходе работы использования «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 ГОУ ВПО Саратовского ГМУ им.В.И.Разумовского (протокол № 1 от 5 сентября 2011 года). При выполнении всех манипуляций животным использовали внутримышечный наркоз (Sol. Zoletili 0,5 %) и его сочетание с местным введением 0,5 % раствора новокаина в дозировках, рассчитанных по массе животного.

**Моделирование ожоговой раны кожи.** Нами в эксперименте на 150 белых лабораторных крысах массой 190–200 г. разработан и запатентован новый способ моделирования ожоговой раны кожи [5], который достигается тем, что на выбранный участок кожи накладывали насадку световода лазера, выполненную в виде медной пластинки необходимой формы и размера, и контактно воздействуют на нее лазерным излучением [6]. С целью инфицирования и нагноения ожоговой раны вносили суспензию с лабораторными штаммами *Pseudomonasaeruginosa* и *Staphylococcusaureus*. Суспензию наночастиц меди получали при смешении эфирного подсолнечного масла (ЭПМ) с 1 мг наночастиц меди в концентрации от 1000 мг/мл до 1 мкг/мл. Оптимальной признана дозировка 0,2 мл в концентрации 1000,100,10 мкг/мл в виде суспензии. Полученную суспензию подвергали обработке на ультразвуковом диспергаторе УЗДН-2Т в режиме: 0,5А, 44 кГц при охлаждении по схеме 1 минута озвучивания – 2 минуты перерыва (3 цикла). Полученный продукт представляет собой бесцветную вязкую жидкость с реологическими свойствами ЭПМ. Суспензия стабильна в течение 5–10 часов, затем часть порошка оседает, однако после активного встряхивания сосуда с суспензией в течение 30 секунд порошок вновь равномерно распределяется в ЭПМ.

**Сочетанное применение наночастиц меди и низкоинтенсивного лазерного излучения на ожоговую рану** изучали в эксперименте на 150 белых лабораторных крысах массой 190–200 г. В ходе эксперимента животным после создания инфицированной термической ожоговой раны в течение 14-ти дней проводили лечение НИЛИ (серия 1), суспензией наночастиц меди (серия 2), сочетанным воздействием лазера и наночастиц меди (серия 3), левомиколем, как препаратом сравнения (серия 4). Контролем (серия 5) служили животные, которым проводили только хирургическую обработку раны, включающую эвакуацию гноя, извлечение инфицированной марлевой салфетки, удаление некротической ткани и промыванием ее антисептиком.

**Хирургический этап** лечения первой фазы раневого процесса включал проведение хирургической обработки в течение первых трех дней после нанесения ожога. Хирургическая обработка раны предусматривала не столько стерилизацию раны, а скорее сокращение микробной контаминации, удаление некротических тканей промыванием ее антисептиком, уменьшение уровня аутолитических ферментов в ране. Первичную некрэктомию выполняли еще до развития в ране обширных воспалительных явлений ее антисептиком. После 3-х суток хирургического лечения начинали второй этап специального лечения. Для комплексной оценки течения раневого процесса в исследовании ежедневно оценивали общее состояние животных, использовали методы планиметрического и микробиологического исследования ран, которые осуществляли на

3-и, 5-е, 7-е, 10-е, 14-е сутки. Через 12 дней лечения, что соответствовало 15-м суткам после воспроизведения ожога, животных взвешивали и выводили из эксперимента передозировкой эфирного наркоза. У животных забирали фрагменты кожи из центра и периферии ожоговой раны (окраска парафиновых срезов Гематоксилином-Эозином и Пикрофуксином). Статистическую обработку результатов проводили с учётом принципов доказательной медицины, с использованием параметрических (критерий Фишера – Снедекора) и непараметрических (критерий Манна – Уитни) методов.

**Результаты исследования и их обсуждение.** При исследовании гистологических препаратов через сутки эксперимента во всех сериях экспериментов в зоне термического воздействия были обнаружены изменения, характерные для ожога IIIБ степени. На 3-и сутки в межлопаточной области у животных формировалась гнойная рана со всеми характерными признаками гнойного воспаления. Наличие инфицированности подтверждалось бактериологическим посевом раневого содержимого. В среднем перед началом лечения обсеменённость ран *Pseudomonasaeruginosa* и *Staphylococcus aureus* составляла  $4300 \pm 51$  КОЕ/мл раневого отделяемого.

Оценка планиметрических и морфологических результатов комбинированного хирургического и специального лечения ран в сериях 1–2 свидетельствует о том, что раневое покрытие суспензией наночастицами меди обладает более эффективным лечебным действием, чем действие НИЛИ. Наиболее отчетливое уменьшение площади ран и сокращение сроков лечения отмечено при сочетанном применении НИЛИ и суспензии наномеди в третьей серии эксперимента, по сравнению с сериями 1,2,4. Так, при изолированном применении лазерного излучения площадь моделированной инфицированной раны кожи ( $400 \text{ мм}^2$ ) сократилась к 7-м суткам до  $168 \text{ мм}^2$ , а к 14-м до  $91 \text{ мм}^2$ , а при сочетанном использовании НИЛИ и наномеди соответственно до  $125 \text{ мм}^2$  к 7-м суткам и до  $41 \text{ мм}^2$  к 14-м суткам лечения. Таким образом, раневое покрытие суспензией наночастицами меди 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.

Анализ сроков очищения раны, появления грануляций и эпителизации выявил следующее. На 7-е сутки лечения у животных 3-ей серии (лазер + наномедь) отмечено полное формирование грануляционной ткани и четкий переход фазы воспаления в фазу регенерации и эпителизации раны. Визуально на 12-е сутки сочетанного лечения отмечалась частичная или даже полная эпителизация раны. В серии животных, не получавших лечение, лишь к 10-м суткам наметилось очищение раны, а к 14-м суткам появление редких грануляций. Сопоставимыми являются результаты серий 2 и 4 с

применением наносуспензий меди и мази «Левомиколь»: грануляции появились спустя 8 суток лечения, а полная эпителизация констатирована лишь спустя 14 суток лечения. Очищение раны, появление грануляций и эпителизации в экспериментах 3-ей серии зарегистрированы, соответственно, на 7-е и 12-е сутки.

Важным показателем заживления инфицированной ожоговой раны является динамика обсеменённости микроорганизмами. Бактериологическое исследование отделяемого из ран животных показало, что при сочетанном лечении (3-я серия) происходит постепенное линейное снижение количества микроорганизмов в ране, максимально выраженное по сравнению с другими группам. Наиболее приближены к данной динамике показатели в группе животных, которым проводили лечение наномедью, что подтверждает выявленный в экспериментах *in vitro* факт усиления лазерным излучением бактерицидного действия низких концентраций наночастиц меди. Однако данный эффект в эксперименте на животных был выражен в меньшей степени по сравнению с экспериментом *in vitro*, что свидетельствует о необходимости назначения оптимальных концентраций наночастиц меди и параметров НИЛИ при лечении инфицированных ожоговых ран.

На 14 сутки применения НИЛИ (1-я серия) гистологическая картина представлена молодой соединительной тканью, большим количеством расширенных полнокровных сосудов, сохраняющейся лейкоцитарной инфильтрацией. На 14 сутки использования суспензии наномеди (2-я серия) под сформированной грануляционной тканью на фоне отека дермы имеются признаки начинающейся эпителизации на фоне сформированного эпидермального слоя. Таким образом, к 14-му дню лечения суспензией наномеди формируется молодая грануляционная ткань с большой капиллярной сетью микроциркуляторного русла и множеством коллагеновых волокон.

Результаты проведенного эксперимента свидетельствуют, что при сочетанном применении НИЛИ и суспензии наночастиц меди отмечается значительное уменьшение площади раны до 41 мм<sup>2</sup> к 14-м суткам лечения, к 7-м суткам ликвидируется бактериальная обсемененность, даже при использовании низких концентраций меди после лазерного облучения раны. Уже к 12-м суткам сочетанного применения НИЛИ и суспензии наномеди рана представлена зрелой соединительной тканью и сформированным эпителиальным пластом. Во всех наблюдениях за животными 3-серии эксперимента на 14-е сутки отмечена полная эпителизация раневого дефекта со всеми слоями и сформированной соединительной тканью. Процесс переходил в заключительную стадию заживления раны – формирование рубца и волосяных фолликулов.

**Заключение.** При хирургическом лечении инфицированной ожоговой раны кожи с сочетанным использованием НИЛИ и наночастиц меди имеет место синергизм антимикробного действия, что приводит к отсутствию микробной обсемененности тканей на 2,0±0,7 суток раньше в сравнении с 1,2 и 4-ой сериями экспериментов. Установлено, что в первой стадии применение данного способа 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 за счет интенсификации пролиферативной активности базальных клеток эпидермиса ускоряется процесс эпителизации и нарастания на грануляционную ткань так называемого вставочного эпидермиса. За счет этого в 1,5 раза сократились сроки гранулирования и эпителизации раны, появление которой отмечено к 11,8±1,0 суткам лечения. Таким образом, установлен терапевтический эффект местного лечения инфицированных ожоговых ран суспензией наночастицами меди и низкоинтенсивным лазерным излучением, причем максимальный эффект терапии отмечен при сочетанном применении НИЛИ и наночастиц меди. Вместе с тем, наряду с перспективностью направления, требуется продолжение дальнейших доклинических испытаний для доработки адекватных доз и рациональных схем проводимого лечения.

### Список литературы

1. Алипов В.В. Экспериментальные лазерные нанохирургические технологии. Первые результаты и перспективы. / В.В.Алипов [и др.] // Вестн. экспер. и клин. хир. – 2011. – № 2. – С. 330-333.
2. Алипов В.В. Lazer nanotechnology in experimetal surgery / Alipov V.V. // International Kongress «EuroMedica 2012». – Hannover, 2012. – P.22-23.
3. Доронин С.Ю., Алипов В.В. Синтез и бактерицидные свойства ультрадисперсного порошка меди / С.Ю. Доронин, В.В. Алипов // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. – 2011. – Т.11. – № 1. – С. 18-22.
4. Патент № 2475251 Российская Федерация, МКП А 61 К 33/34 Способ комбинированного лечения абсцессов в эксперименте / В.В. Алипов, М.С. Лебедев, С.Ю. Доронин С.Ю.; опубл. 20.02.2013. Бюл. № 5.
5. Патент № 2472232 Российская Федерация, МКП G 09В 23/28 Способ моделирования термической ожоговой раны кожи у лабораторных животных / А.В. Колсанов, В.В. Алипов, Е.А. Добрейкин; опубл. 10.01.2013.

6. Перспективные нанотехнологии в области экспериментальной медицины / В.Н. Николенко, В.А. Алипов, О.А. Фомичева, М.С. Лебедев, Х.М. Цацаев // *Нанотехника*. – 2009. – № 19. – С. 66-68.
7. Bystrzejska-Piotrowska G., Golimowski J., and Urban P. L. Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management / G.Bystrzejska-Piotrowska // *Waste Management*. – 2009. – P. 2587–2595.
8. Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S.-I., Tsutsumi Y. and Yagi K. Silica nanoparticles as hepatotoxicants / H. Nishimori // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2009. – P. 496-501.
9. Tuner J.,Hode. L.Laser therapy in dentistry and medicine. / J.Tuner // *Prima Books*. – 2006. – 236 p.

**Рецензенты:**

Громов М.С., д.м.н., профессор, ректор НОУ ВПО Медицинский институт «Реавиз», Саратовский филиал, г. Саратов;

Капралов С.В., д.м.н., заведующий 1-м хирургическим отделением МУЗ «Городская клиническая больница № 2 им. В.И. Разумовского», г. Саратов.