

**Методика моделирования острого местного гнойно-воспалительного процесса у лабораторных животных и проведения эксперимента по лечению полученных гнойных ран с помощью фоторегуляторной и фотодинамической терапии**

*УО «Белорусский государственный медицинский университет». Кафедра общей хирургии.  
Научный руководитель: д.м.н., профессор Г.П.Рычагов*

В статье изложена методика моделирования местного гнойно-воспалительного процесса у крыс, также представлена разработанная методика по лечению полученных гнойных ран с помощью фотодинамической терапии с применением нового аппарата "Ромашка" и аппарата "Родник-1".

Ключевые слова: эксперимент, крысы, гнойная рана, фотосенсибилизатор, фотодинамическая терапия.

Антибиотикорезистентность микроорганизмов остается актуальной проблемой до настоящего времени, несмотря на достижения современной медицинской науки и антимикробной химиотерапии. Это увеличение устойчивости к антибактериальным препаратам связано в первую очередь с широким применением антибиотиков, что приводит к ограничению или невозможности использования целых групп антибактериальных препаратов для лечения инфекций, вызванных антибиотикорезистентными штаммами микроорганизмов. В связи с этим встает вопрос о необходимости выбора средств терапии таких инфекций. Кроме того, современные стандарты оказания медицинской помощи подразумевают комплексную терапию инфекционных заболеваний, включающую в себя помимо традиционной антибактериальной терапии различного рода физические воздействия на инфекционный процесс, в том числе методики, использующие когерентные и некогерентные источники света [1,5].

В рамках изучения воздействия фотодинамической и фоторегуляторной терапии на течение острого гнойно-воспалительного процесса и динамику ранозаживления нами было выполнено моделирование на лабораторных животных гнойной раны. Эксперимент проводился в клинической экспериментальной лаборатории (виварии) Белорусского государственного медицинского университета.

В самом начале работы мы применяли различные методики моделирования: иссекали разные по площади кожные лоскуты, использовали взвесь микроорганизмов, содержащей 10<sup>6</sup> микробных тел в 1 мл, вводили различные объёмы взвеси (от 0.5 до 1.5 мл) как подкожно, так и в полученную плоскостную рану, также заражали рану собственным калом животного, но гнойные раны нами получены не были. Абсцессы не формировались, а раны заживали под струпом.

Целью нашего исследования явилось определение возможности улучшения результатов лечения гнойных ран за счет местного применения фотодинамической терапии.

Проведение эксперимента осуществлялось по следующей схеме:

- 1) Моделирование местного острого гнойно-воспалительного процесса у крысы.
- 2) Фототерапевтическое воздействие на гнойно-воспалительный процесс многоцветным фототерапевтическим комплексом «Ромашка» и аппаратом «Родник-1» с целью изучения фотодинамической терапии с использованием фотосенсибилизатора «Фотолон» и метиленового синего.
- 3) Использование для лечения только фотосенсибилизаторов.
- 4) Использование для лечения только фототерапевтическое воздействие на гнойно-воспалительный процесс многоцветного фототерапевтического комплекса «Ромашка» и аппарата «Родник-1»

Задачей исследования является сравнение различных методов лечения.

Материалы и методы.

Для поведения эксперимента использованы: многоцветный фототерапевтический комплекс «Ромашка», основанный на сверхъярких светодиодах, который разработан в государственном научном учреждении «Институт физики им. Степанова» НАН Республики Беларусь (взяты излучатели с длиной волны 630 и 410 нм), лазерно-светодиодный аппарат «Родник-1» (взяты излучатели с длиной волны 670 и 470 нм), фотосенсибилизаторы «Фотолон» и метиленовый синий, крысы-самцы линии Wistar массой от 180 до 250 грамм. В качестве индикаторных для гнойной хирургической инфекции микроорганизмов взяты штаммы: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium difficile* [1, 5, 6].

Все животные находились на стандартном рационе питания в виварии БГМУ со свободным доступом к пище и воде. Условия содержания животных: температура воздуха в боксе 18-20°C при относительной влажности 55%. Перед началом проведения эксперимента животные выдерживались в выделенном боксе в течение одной недели для адаптации к новым условиям. Перед проведением эксперимента все животные взвешивались, тщательно осматривались на наличие видимой патологии и признаков болезней. Животные с выявленной патологией выбраковывались и в эксперимент не включались. Все работы с крысами проводились в соответствии с «Положением о порядке использования экспериментальных животных в научно-исследовательских работах и учебном процессе в Белорусском государственном медицинском университете» (утверждённом на заседании учёного совета БГМУ в 2006г.). [2]

Моделирование гнойной раны, последующее специфическое и неспецифическое лечение её, содержание животных, выведение их из эксперимента и забор материала проходили в выделенном отдельном боксе, соответствующем всем правилам и нормам при работе с условнопатогенными микроорганизмами, с соблюдением всех правил асептики и антисептики. [3,4]

Применяемая технология моделирования острого местного гнойно-воспалительного процесса.

На предварительно депилированной коже бедренно-ягодичной области крысы маркером при помощи картонного шаблона наносился контур будущей раны: окружность диаметром 2,5 см. Кожа обрабатывалась дважды антисептиком «Инол». Выполнялась местная анестезия 0,5% раствором новокаина 3,0 мл. По истечении 7-10 минут скальпелем отсекалась кожа и подкожная клетчатка до поверхностной фасции. Далее зажимом Кохера раздавливались края раны и подлежащие мышцы.

Затем дно и края раны заражались 24-часовой взвесью смеси микробов, взятых в равных объёмах, содержащей в 1 мл 10<sup>9</sup> микробных тел (концентрация определялась по стандарту мутности). Объём вводимой взвеси микробов составлял 2 мл. После этого, с целью создания герметизма, предотвращения травмирования раны и обсеменения окружающими микроорганизмами, к краям раны подшивалось пластмассовое кольцо с высотой бортика 1,2 см и диаметром 2,5 см с крышечкой. Использовался обвивной непрерывный шов капроновой нитью.

В подшитое таким образом кольцо вставлялся сухой стерильный марлевый шарик. Крышечка закрывалась путем подшивания ее к кольцу отдельным узловым швом. После этого крысы находились в индивидуальных клетках для предотвращения перегрызания лигатур и нанесения дополнительных травм друг другу. Доступ к пище и воде был свободным.

Результаты и обсуждение. Гнойные раны у крыс формировались спустя 48 часов и имели классические признаки воспаления. Края раны с участками некроза, незначительно гиперемизированные, пастозны. Дно ран было влажным, имело цвет от желто-зеленого и бордово-синюшного до черно-некротического с участками некроза ранее травмированных мышц и наложениями фибрина. Отделяемое из ран, которым был пропитан марлевый шарик, поставленный в первый день эксперимента, было гнойное в умеренном количестве от 0,5 до 1,0 мл желто-зеленого цвета с геморрагическим компонентом, мутное, со зловонным запахом.

У всех животных были одинаковые по форме, площади и расположению раны, что являлось важным для дальнейшего их сравнения и последующего анализа динамики ранозаживления.

У некоторых животных развивалась гнилостная инфекция в области раны, гангрена задней конечности, генерализация инфекционного процесса. Эти животные в дальнейшем эксперименте не участвовали, выводились из эксперимента путем передозировки тиопенталового наркоза (с учётом положения о гуманном обращении с животными).

Все животные разделялись на контрольные и опытные группы в зависимости от применяемого метода лечения. В каждой группе по 20 крыс. Общее количество животных не менее 200.

В процессе эксперимента для оценки эффективности лечения осуществляли тщательное динамическое наблюдение за общим состоянием животных, местным течением раневого процесса, ходом заживления раны. Оценивались скорость кожной контракции, скорость образования первичного и вторичного струпа, характер отделяемого из раны – его цвет, запах, количество. Следили за изменениями показателей периферической крови, изменением уровней провоспалительных и противовоспалительных цитокинов крови и цитокинов в ране, качественным и количественным изменением динамики высеваемости микроорганизмов из раны. В связи с этим через определенные промежутки времени часть крыс выводилась из эксперимента. Забор материала происходил на 3, 7, 10, 14, 21, 28-е сутки от начала эксперимента. Обычно из каждой группы в указанные сроки выводилось по 3-4 крысы. Также оценивали показатель «выживаемость-летальность». Велась динамическая фотосъемка.

На третьи сутки от момента заражения в зависимости от предполагаемого метода лечения проводились следующие манипуляции.

У животных, лечение которых проводилось только с помощью фотосенсибилизаторов, на 3-и сутки после заражения открывалась крышечка пластмассового кольца, удалялся марлевый шарик, поставленный в первый день эксперимента, и на его место помещался другой стерильный марлевый шарик, смоченный 3 мл раствора «Фотолон» или метиленового синего. Крышечка кольца закрывалась. На следующие сутки проводилось удаление пластмассового кольца с марлевым шариком.

У животных, лечение которых проводилось только с помощью аппаратов «Ромашка» и «Родник-1», на 3-и сутки после заражения проводилось удаление пластмассового кольца и раны облучались вышеуказанными аппаратами. Время облучения 5 минут.

Фотодинамическое воздействие проводилось следующим образом: на 3-и сутки после заражения животных открывалась крышечка пластмассового кольца, удалялся марлевый шарик, поставленный в первый день эксперимента. На его место в кольцо помещался другой стерильный марлевый шарик, смоченный 3-я мл раствора фотосенсибилизатора. Крышечка кольца закрывалась. На следующие сутки проводилось удаление пластмассового

кольца с марлевым шариком и выполнялось облучение раны лазерным или нелазерным источником света. Время облучения 5 минут.

Спустя три дня после снятия кольца с крышечкой (на 6-е сутки эксперимента) вне зависимости от способа лечения имела место кожная контракция раны примерно на 1/5, рана покрывалась плотным темным струпом, который достаточно плотно был фиксирован к её дну и из-под которого выделялся густой гной зелено-желтого цвета.

Спустя 8-10 суток от момента снятия кольца образовывался вторичный струп, более тонкий и не так сильно фиксированный ко дну раны, легко снимался хирургическим пинцетом. Отделяемое было серозно-гнойным умеренным; раны уменьшались в размере приблизительно на 1/3.

На фоне проводимого лечения раны постепенно очищались, и дальнейшее заживление происходило под струпом. Кожная контракция составляла примерно 1 мм за сутки, что соответствовало 4% от диаметра раны.

Выведение животных из эксперимента осуществлялось под тиопенталовым наркозом (2,5 мг/кг) путём декапитации. Забиралась кровь в количестве 4-5 мл в стерильные пробирки с раствором гепарина в расчете 100 ЕД в 0,5 мл 0,9% раствора NaCl на 4-5 мл крови. Кровь использовалась для выполнения общего анализа крови, определения фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа, определения провоспалительных и противовоспалительных цитокинов.

После забора крови животное усыплялось передозировкой тиопенталового наркоза. Отделяемое из раны бралось на бактериологический посев. Определялся количественный и качественный состав высеваемых микроорганизмов. Кусочки кожи, включающие рану и прилежащие участки, брали для морфологического исследования, материал фиксировали в формалине, проводили в батарее спиртов восходящей крепости, заливали в парафин и изготавливали срезы толщиной 5 мкм. Гистологические изменения в области раны изучали на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Процесс формирования коллагеновых волокон изучали при окраске по Ван-Гизон и MSB (марциус-алый-голубой). Микроорганизмы окрашивали по Гимза. Часть ткани из раны забиралась для определения тканевых цитокинов.

В периферической крови подсчитывали содержание лейкоцитов; готовили тонкие мазки и определяли формулу белой крови.

Проводили постановку тестов индукции цитокинов. Стабилизированную гепарином кровь (1 мл) смешивали с 2 мл полной среды RPMI 1640 с глутамином, бикарбонатом натрия, антибиотиками, меркаптоэтанолом и 10% ЭТС. Для стимуляции продукции цитокинов использовали ФГА, SIGMA, США, 20 мкг/мл. Культуры со стимулятором и без (спонтанная продукция) культивировали 72 часа при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Супернатанты отделяли, аликвотировали и хранили при -200°C до исследования.

Проводили постановку фагоцитоза. Суточную культуру золотистого стафилококка отмывали физиологическим раствором. Стабилизированную периферическую кровь центрифугировали, отбирали пленку лейкоцитов. 50 мкл взвеси лейкоцитов/эритроцитов смешивали с равным объемом стафилококка, инкубировали 30 минут при 37°C, охлаждали на льду, центрифугировали 3 минуты при 3000 об/мин и готовили тонкие мазки. Подсчитывали фагоцитарный индекс и фагоцитарное число по общепринятой методике.

Определение цитокинов в периферической крови (сыворотке) и супернатантах культур. Содержание цитокинов (ФНО-альфа, ИФН-гамма и ИЛ10) определяли с помощью ИФА с применением наборов Duo Set ELISA Development System производства R&D Systems, США, согласно инструкции производителя.

Таким образом, нами получена экспериментальная модель местного острого гнойно-воспалительного процесса.

Проведённые исследования позволяют оценить эффективность метода фотодинамической терапии при аппликационном способе применения фотосенсибилизаторов «Фотолон» и метиленового синего с использованием аппаратов «Ромашка» и «Родник-1». Полученные клинические, гистологические, микробиологические и иммунологические данные свидетельствуют, что фотодинамическая терапия с лазерным и нелазерным источником света является достаточно эффективным неинвазивным методом лечения гнойных ран и служат обоснованием применения метода фотодинамической терапии в клинической практике для лечения местных острых гнойно-воспалительных процессов, в частности для лечения гнойной проктологической патологии.

#### **Литература**

1. Кумова, И.В. Микробиологическое обоснование эффективности применения фотодинамической терапии в колоректальной хирургии / И.В. Кумова, А.И. Жмакин, И.Г. Жук // Медицинский журнал БГМУ. 2007. № 1. С. 58–60.

2. «Положением о порядке использования экспериментальных животных в научно-исследовательских работах и учебном процессе в Белорусском государственном медицинском университете». Минск: Изд-во БГМУ, 2006. 6 с.

3. Республиканские санитарно-гигиенические и санитарно-противоэпидемические правила и нормы. Безопасность работы с микроорганизмами 3 и 4 групп патогенности и гельминтами. Санитарные правила СП 17-129 РБ 2000. Минск: Министерство здравоохранения Республики Беларусь, 2002. 52 с.

4. Республиканские санитарные нормы, правила и гигиенические нормативы. Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев). Санитарные правила и нормы 2.1.2.12-18-2006. Минск: Министерство здравоохранения Республики Беларусь, 2006. 19 с.

5. Рычагов, Г.П. К обоснованию фотодинамической терапии при гнойной патологии / Г.П. Рычагов, В.М. Русинович, В.А. Гинюк // Актуальные вопросы современной хирургии: материалы науч. конф., посвящ. 60-летию со дня рождения проф. Ю.С. Винника. Москва-Красноярск, 2008 г. С. 387–391.

6. Фотодинамическое воздействие на бактериальную микрофлору ран в эксперименте / П.И. Толстых, Е.Ф. Странадко, У.М. Корабоев и др. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2001. № 2. С. 85–87.