

УДК: 616-002-008.953.616-08-031.84

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ
ИНФИЦИРОВАННЫХ РАН ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ВЫСОКОИНТЕНСИВНОГО
ШИРОКОПОЛОСНОГО ИМПУЛЬСНОГО ОБЛУЧЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

В.С. Егоров^{1,2}, А.Ю. Филимонов¹

¹Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова ДЗМ, Москва, Россия

²Российский университет медицины, Москва, Россия

Резюме. Целью исследования послужило дать оценку эффективности применения высокоинтенсивного импульсного широкополосного облучения инфицированных ран в эксперименте. Изучено 105 препаратов ран крыс-самцов Vistar с экспериментально смоделированными инфицированными ранами. Сформировано 3 равных группы животных, которым ежедневно проводили обработку ран 0,1% водным раствором хлоргексидина биглюконата. В 1-й группе обработку ран дополняли высокоинтенсивным импульсным широкополосным облучением, во 2-й – воздействием традиционного ультрафиолетового облучения. В 3-й группе проводили обработку только раствором антисептика. Контрольные точки исследования: перед началом лечения, а также на 7, 14 и 21-ые сутки лечения. Статистический анализ выполнен при помощи непараметрических методов статистики.

В 1-й группе на 21-е сутки лечения в препаратах было отмечено ремоделирование соединительной ткани сопровождающееся образованием нежного рубца. Во 2-ой группе - явления ремоделирования соединительной ткани. 3-ей группе отмечено уменьшение инфильтрации с замедленным образованием новых сосудов.

Результаты морфологического исследования показали, что применение высокоинтенсивного импульсного широкополосного облучения инфицированных ран в более ранние сроки способствует купированию воспалительной реакции тканей, а также активизирует местную иммунную реакцию и ускоряет процессы ремоделирования соединительной ткани в сравнении с традиционным ультрафиолетовым облучением и простым лечением ран раствором антисептика.

Ключевые слова: инфицированные раны, раневой процесс, высокоинтенсивное импульсное широкополосное облучение, ультрафиолетовое облучение, регенерация, эпителизация, раневая поверхность.

**MORPHOLOGICAL FEATURES OF THE COURSE OF REGENERATIVE PROCESSES OF
INFECTED WOUNDS UNDER THE IMPACT OF HIGH-INTENSITY BROADBAND PULSED
IRRADIATION IN THE EXPERIMENT**

V.S. Egorov ^{1,2}, A.Yu. Filimonov ¹

Abstract. *The research objective was to evaluate the effectiveness of high-intensity pulsed broadband irradiation of infected wounds in an experiment. 105 wound preparations of Vistar male rats with experimentally modeled infected wounds were studied. Three equal groups of animals were formed, which received daily wound treatment with a 0.1% aqueous solution of chlorhexidine bigluconate. In the 1st group, wound treatment was supplemented with high-intensity pulsed broadband irradiation, in the 2nd - with traditional ultraviolet irradiation. In the 3rd group, only an antiseptic solution was used for treatment. The control points of the study were before the start of treatment, as well as on the 7th, 14th and 21st days of treatment. Statistical analysis was performed using nonparametric statistical methods. In the 1st group, on the 21st day of treatment, connective tissue remodeling was noted in the preparations, accompanied by the formation of a delicate scar. In the 2nd group - connective tissue remodeling phenomena. The 3rd group showed a decrease in infiltration with a slow formation of new vessels. The results of the morphological study showed that the use of high-intensity pulsed broadband irradiation of infected wounds at an earlier stage helps to stop the inflammatory reaction of tissues, and also activates the local immune response and accelerates the processes of connective tissue remodeling in comparison with traditional ultraviolet irradiation and simple treatment of wounds with an antiseptic solution.*

Key words: *infected wounds, wound process, high-intensity pulsed broadband irradiation, ultraviolet irradiation, regeneration, epithelialization, wound surface.*

Введение. Учитывая все возрастающую лекарственную устойчивость микроорганизмов к антибиотикам, многими авторами был осуществлен поиск способов, дополняющих традиционное хирургическое лечение, с целью улучшить качество хирургической обработки ран различной этиологии с применением физических методов воздействия [2, 5]. В хирургической практике известно применение методов, основанных на излучении света, такие как ультрафиолетовое, лазерное, инфракрасное облучение тканей, а также воздействие спектров видимого света. Современные литературные данные содержат много информации о клинической, бактерицидной и иммунологической эффективности применения различных методов фототерапии, однако следует отметить, что исследований, где подробно описаны морфологические основы эффективности их применения, в том числе и ультрафиолетового облучения к настоящему времени очень мало [6, 8, 9].

Оптимальный подход в лечении инфицированных ран определяется сочетанием устранения или компенсации основных причинных факторов и эффективного локального лечебного воздействия на осложненный раневой дефект.

По данным экспериментальных и клинических исследований использование технологий на основе высокоинтенсивного ультрафиолетового излучения сплошного спектра позволяет в кратчайшие сроки снизить контаминацию инфицированных ран, что дает возможность рекомендовать применение таких фототерапевтических устройств для лечения тяжелых инфекционных заболеваний, протекающих на фоне выраженных иммунодефицитных и аллергических явлений [1]. Воздействие импульсного высокоинтенсивного оптического облучения является высокоэффективным методом, обладающим мощнейшим биоцидным и иммуностимулирующим действием. В дополнение к основным задачам лечения, таким, как подавление микробной флоры, следует рассматривать возможность стимуляции регенеративных процессов в ране. Такими возможностями обладает воздействие высокоинтенсивного импульсного широкополосного облучения, однако его влияние на инфицированный раневой процесс изучено недостаточно. Наряду с обоснованной необходимостью анализа клинических результатов применения высокоинтенсивного импульсного широкополосного облучения, представляется важным изучить особенности его взаимодействия с тканями на ультраструктурном уровне, что возможно только в эксперименте. Все это стало основанием для проведения настоящего экспериментального исследования.

Цель: дать оценку эффективности применения высокоинтенсивного импульсного широкополосного облучения инфицированных экспериментальных ран по средством морфологических методов исследования.

Материал и методы. Выполнено морфологическое исследование препаратов ран 105 крыс-самцов линии Vistar, которым в эксперименте моделировали инфицированные раны. Исследование одобрено Межвузовским комитетом по этике (выписка из протокола № 06-23 от 15.06.23) и проведено в условиях вивария ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России. Животным под общим обезболиванием моделировали рану в области холки 20x20 мм. В последнюю инфицировали триггером (пропитка марлевого шарика, подшитого к ране) смеси культур из контрольных лабораторных штаммов *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* в равных объемах и разведениях, содержащей в 1 мл 10^9 микробных тел. На следующие за датой инфицирования сутки удаляли триггер и формировали 3 равных группы животных, разделенных случайным образом. Ежедневно всем животным выполнялась ежедневная обработка раны 0,1% водным раствором хлоргексидина биглюконата.

Животным 1-й группы в течение 10-и дней лечение дополняли высокоинтенсивным импульсным широкополосным облучением. Процедуру выполняли при помощи аппарата, периодическом режиме с частотой импульсов 5 Гц и средней электрической мощностью 100 Вт. Спектр излучения сплошной, непрерывно перекрывающий не только УФ спектр, но и видимую и

инфракрасную области. (спектральный диапазон 200-2700 нм, где значительная энергии приходится на ультрафиолетовый диапазон). Средняя мощность излучения лампы в УФ-С диапазоне спектра (200-280 нм) составляла 3 Вт, импульсная мощность УФ-С излучения – 24 кВт. Программное обеспечение использованного аппарата включало следующие режимы терапии: 1-ый режим – 50 импульсов с длительностью цикла облучения 10 секунд; 2-ой режим – 100 импульсов в течение 20 секунд; 3-ий режим – 200 импульсов с длительностью 40 секунд. Учитывая обсемененность и обширность моделированных ран, для борьбы с инфекцией и купирования воспаления облучение ран в первые пять дней лечения проводили с использованием 3-го режима с расстоянием 5-и см от раны, начиная с шестого дня лечения и последующие пять дней использован режим 2 на расстоянии 10-и см от ран.

Лечение 2-й группы животных было дополнено традиционному ультрафиолетовому облучению аппаратом ОУФК-01 «Солнышко», на основе УФ ртутной бактерицидной лампы типа ДКБУ-7, электрической мощностью 7 Вт, мощность УФ-С излучения (254 нм) лампы составляла 1,2 Вт в течение 3-х минут.

Лечение 3-й группы животных (контроля) проводилось только с местным применением антисептика.

Все манипуляции с лабораторными животными выполнялись с соблюдением всех необходимых установленных требований.

С целью обеспечения контроля морфологической картины перед началом лечения в каждой из 3-х групп по 5 лабораторных животных было выведено из эксперимента. На 7, 14 и 21-е сутки – по 10 животных в каждой группе. После эвтаназии животных, производили иссечение мягких тканей, содержащих раневую поверхность. Препарат подвергали фиксации в 10% растворе формалина. В дальнейшем из макропрепаратов изготавливали парафиновые блоки и гистологические препараты по стандартной методике. Морфологическое исследование проводили на препаратах, окрашенных гематоксилином-эозином, толщиной среза 5 мкм.

Электронно-микроскопическое исследование выполнено на электронном микроскопе фирмы JEM 100 CX (JEOL, Япония) в трансмиссионном режиме при ускоряющем напряжении 80 кВ. Для выполнения исследования биологический материал был фиксирован в растворе глутаральдегида (2,5%), а затем в растворе оксида осмия (1%) и заключали в смесь аралдитовых смол. Полутонкие срезы (1-1,5 мкм) окрашивали толуидиновым синим. Ультратонкие срезы контрастировали уранил ацетатом и цитратом свинца.

Для качественного и количественного исследования гистологические препараты предварительно были отсканированы на цифровом сканере PANNORAMIC 250 Flash (3DHISTECH Ltd. Венгрия) с последующим изучением их при помощи программы Pannoramic Viewer 1.15.4 (3DHISTECH Ltd. Венгрия),

Статистическая обработка полученных результатов проведена при помощи программ Microsoft Office Excel и Statistica 10.0.1011 (StatSoft, Tibco, USA). Анализ проведен при помощи непараметрических методов статистики, так как предварительное исследование показало неравную дисперсию исследованных нами признаков.

Результаты. При статистическом анализе количественного состава клеток до начала лечения существенной разницы в сравнении между всеми 3-я группами выявлено не было. В препаратах ран наблюдались нейтрофильная и лимфоцитарная инфильтрация с участками кровоизлияния. Сосуды и капилляры были паралитически расширены или заполнены эритроцитами, а эндотелий сосудов был набухший. Коллагеновые волокна, присутствовавшие в ранах, были повреждены и также набухшие. В дне раны, среди жировой ткани, отмечается наличие большого количества тучных клеток в разной степени дегрануляции. В мышечной ткани были отмечены очаги кровоизлияния, также с признаками отека и содержанием поврежденных сосудов с набухшим эндотелием. Края раны были окаймлены утолщенным эпидермисом, с явлениями отека.

На 7-й день в препаратах животных всех групп по-прежнему отмечаются признаки отека. Однако уже наблюдается тенденция к уменьшению и трансформации инфильтрата. Так в препаратах 1-ой группы участки инфильтрации уже приобретают вид слоистой структуры, а также отмечено появление гранул гемосидерина, расположенных свободно в межклеточном пространстве и макрофагах, окрашивая последние в коричневый цвет. В других группах уменьшение инфильтрата было менее значительно. Так у 2-ой группы животных отмечалась инфильтрация в виде розеток вокруг мелких сосудов, а в препаратах ран 3-ей группы были отмечены признаки тромбирования как мелких, так и более крупных кровеносных сосудов. В ране нейтрофилы имели признаки нетоза. Во всех группах отмечалась дегрануляция тучных клеток. В препаратах 1-ой и 2-ой групп животных было отмечено появление молодых фибробластов, которые в 1-ой группе животных выстраивались тяжами, ориентированными параллельно к поверхности раны, а во 2-ой группе животных такая ориентация клеток не определялась.

К 7-м суткам лечения в препаратах всех групп животных в сравнении с предыдущей точкой контроля отмечено существенное снижение количества нейтрофилов. При сравнении их количества между группами отмечается статистически достоверная разница: в препаратах 1-ой группы количество нейтрофилов меньше по сравнению со 2-ой и 3-ей группами ($p < 0,0001$ для обеих групп), а во 2-й - нейтрофилов меньше по сравнению с 3-й группой ($p < 0,0001$). Также в препаратах животных 1-ой группы снижается количество лимфоцитов по сравнению с предыдущей точкой контроля, а также в сравнении с другими группами. У животных всех групп в ранах отмечено появление макрофагов, которых существенно больше в препаратах ран животных 1-й группы ($p < 0,0001$ по сравнению со 2-й и 3-й группами) и 2-ой группы ($p < 0,0001$ по сравнению с 3-ей

группой). К 7-м суткам лечения ран в ответ на проводимую терапию в препаратах ран животных 1-ой и 2-ой групп отмечено увеличение количества плазмоцитарных клеток.

Морфологическое исследование препаратов ран на 14-е сутки лечения показало, что в препаратах 1-ой группы животных воспалительная инфильтрация тканей была минимальной. Фибробласты, ориентированные параллельно поверхности раны, находятся в состоянии высокой функциональной активности, что было подтверждено ультраструктурным анализом. В этот период они синтезировали белки, в том числе коллаген. Также отмечается рост новых сосудов к центру раны и перпендикулярно поверхности раны, вдоль которых отмечено группирование фибробластов. Количество тучных клеток единичное. Эти клетки находятся в состоянии частичной дегрануляции. Во 2-ой группе отмечено уменьшение уровня инфильтрации. В некоторых препаратах было замечено образование новых капилляров. В этой контрольной точке в препаратах 3-й группы все еще сохраняется струп, под которым по-прежнему сохраняются инфильтрат и отек, а также в поле зрения наблюдаются нейтрофилы и макрофаги. Инфильтрация на отдельных участках имеет распространение до мышечной и жировой ткани. Гистологических признаков ремоделирования соединительной ткани не было отмечено.

Количественный анализ показал, что нейтрофилов и лимфоцитов на 14-е сутки лечения становится существенно меньше, чем на 7-е сутки. Динамика макрофагов в каждой группе разная, так в 1-ой группе их количество по сравнению с 7-ым днем лечения и по сравнению с другими группами статистически значимо меньше ($p < 0,0001$ для всех указанных показаний). В препаратах 2-ой группы количество макрофагов сохраняется на таком же уровне по сравнению с предыдущим днем контроля ($p = 0,89$), но при этом существенно меньше по сравнению с показателями в 3-ей группе ($p < 0,0001$). А в препаратах ран 3-ей группы показатели макрофагов увеличились по сравнению с 7-м днем лечения, что указывало на более позднюю реакцию на проводимое лечение. В то же время во всех группах выявлено существенное уменьшение количества дегранулирующих базофилов ($p < 0,0001$ для всех групп), при этом в 1-й и 2-й группе увеличивается их содержание ($p < 0,0001$). Популяции тучных клеток 1-ой и 2-ой групп восстанавливают свою функциональную активность. Со стороны соединительнотканного компонента отмечается рост содержания фибробластов в 1-ой и 2-ой группах. В препаратах ран 3-й группы появляются единичные базофилы и фибробласты.

К 21-му дню лечения отмечается статистически значимая динамика морфологических признаков. Так при исследовании препаратов ран животных 1-ой группы, которым в лечении применено высокоинтенсивное импульсное широкополосное облучение, наблюдается ремоделирование соединительной ткани в пользу полного восстановления структуры. Во 2-ой группе животных, которым в лечении ран использовали традиционное ультрафиолетовое облучение, сохраняется макрофагальная реакция. Под струпом достаточно спокойная соединительная ткань. В

ней присутствуют капилляры, хотя и в меньшем количестве, чем в 1-ой группе. В препаратах ран животных 1-й и 2-й групп в соединительной ткани большое количество тучных клеток в неактивном состоянии. В 3-й группе сохраняется примесь нейтрофилов, тромбоз мелких сосудов. Сохраняется отек, который выражен в соединительной и жировой ткани.

Обсуждение. Заживление ран – это сложный биологический процесс с последовательно протекающими физиологическими и морфологическими фазами. Чтобы восстановить барьерную функцию поврежденных кожных покровов необходима координация клеточных и молекулярных процессов. В первую фазу раневого процесса (воспаления) клеточные элементы, такие как нейтрофилы и макрофаги, мигрируют в рану, мобилизуя местную и системную защиту. Во второй фазе (пролиферации) наступает активная пролиферация клеток соединительной ткани, фибробластов и кератиноцитов, тем самым запускается процесс ремоделирования соединительной ткани. В третьей фазе раневого процесса (регенерации или эпителизации) происходит организация нового матрикса в следствие того, что фибробласты начинают синтезировать коллаген.

С целью оценки процесса заживления ран существуют различные методы, среди которых можно выделить планиметрию и морфологическое исследование. Использование планиметрии позволяет дать оценку видимой характеристике раны, но из-за наличия струпа, зачастую, не может сопоставлено с показателями заживления, доступными при морфологическом исследовании. Таким образом последнее можно отнести к “золотому стандарту” оценки заживления ран.

Среди современных литературных источников можно найти не мало информации, в отношении использования методов, основанных на излучении света в лечении ран различной этиологии, в том числе инфицированных, но во многих случаях эти исследования относятся к области использования лазеро- или фотодинамической терапии, где авторы указывают на клиническую, бактерицидную и морфологическую эффективность их применения [3, 4]. Работ же, посвященных изучению комплексной оценки применения ультрафиолетового облучения при лечении инфицированных ран, сравнительно невелико, при этом имеющиеся исследования показывают преимущественно только бактерицидную эффективность [2, 7].

Так К. Narita и соавт. в эксперименте на биологических моделях мышах, смоделировав инфицированную St. Aureus (MRSA) рану, облучали двумя типами ламп с излучением в диапазоне 222 нм и 254 нм. Авторами проведен бактериологический, гистологический и иммуногистохимический контроль. При морфологическом исследовании авторы отметили снижение воспалительной реакции при ультрафиолетовом облучении инфицированных ран в диапазоне 222нм. Однако в своем исследовании авторы выполнили гистологический анализ только на 5-ый и 8-ой дни, с оценкой только нейтрофильной инфильтрации без статистической оценки полной морфологической картины [7].

В.В. Багров и соавт. показали бактерицидную, клиническую и морфологическую эффективность антибактериальной терапии в комбинации с высокоинтенсивным оптическим облучением инфицированных ран по сравнению с традиционным применением мази «Левомиколь». Гистологический анализ показал более ранний переход раневого процесса (14-ые сутки) в фазу грануляции у животных, раны которых были подвержены высокоинтенсивному оптическому облучению, по сравнению с ранами животных контрольной группы [2].

Исходя из этого можно сделать вывод, что литературные данные о применении ультрафиолетового облучения инфицированных ран ограничены, и представлены в основном описанием бактерицидной эффективности. В имеющихся исследованиях морфологические признаки регенерации тканей представлены только на начальных стадиях раневого процесса, на стадиях воспаления и пролиферации, и нет данных о полной морфологической картине, происходящей в ране в ходе лечения с применением ультрафиолетового облучения вплоть до завершения регенеративных процессов.

В нашем исследовании, представлен качественный и количественный анализ морфологической картины при использовании высокоинтенсивного импульсного широкополосного облучения, традиционного ультрафиолетового облучения и классического местного применения антисептика.

Выполненное нами экспериментальное исследование, посвященное оценке эффективности применения высокоинтенсивного импульсного широкополосного облучения в лечении ран, инфицированных смешанной микробной флорой, показало, что до начала лечения морфологическая картина ран соответствовала фазе острого воспаления. На 7-ой день в 1-ой группе морфологическая картина уже соответствовала фазе пролиферации в сравнении со 2-й и 3-й группами, где отек и инфильтрация еще сохранялись. К 14-му дню в 1-ой группе были отмечены признаки формирования грануляционной ткани и переход ран в стадию регенерации. В это же время во 2-й группе было отмечено уменьшение инфильтрации, а также появление новых капилляров. Наблюдалось увеличение количества фибробластов. При этом признаки воспаления по прежнему сохранялись в 3-й группе. В группе животных, лечение которых было дополнено высокоинтенсивным импульсным широкополосным облучением к 21-му дню в препаратах ран признаков воспаления не наблюдалось. Также в этой группе были отмечены признаки ремоделирования соединительной ткани с образованием нежного рубца. В группе животных, лечение которых дополнялось применением традиционного ультрафиолетового облучения наблюдали минимальные признаки инфильтрации. Также в этой группе отмечены явления ремоделирования соединительной ткани, в которой присутствовали новые капилляры. В препаратах ран 3-ей группы животных, лечение которых заключалось в ежедневной обработке раствором антисептика, без дополнительных методов

воздействия инфильтрация была уже меньше. Образование новых сосудов происходило с замедлением.

Выводы. Согласно данным, полученным в ходе морфологического исследования, можно сделать вывод, что применение в эксперименте высокоинтенсивного импульсного широкополосного облучения в комплексном лечении инфицированных ран в сопоставимом сравнении с традиционным ультрафиолетовым облучением, а также местным лечением раствором антисептика приводит к более ранним срокам купирования воспалительных реакций в тканях, активизации местных иммунных процессов и ускорению ремоделирования соединительной ткани.

Список литературы

1. Абдувосидов Х.А., Матвеев Д.В., Семенов С.В. и др. Оптимизация местного лечения венозных трофических язв в фазе воспаления // Стационарозамещающие технологии: Амбулаторная хирургия. – 2012. – № 4. – С. 6-11.
2. Архипов В.П., Багров В.В., Бяловский Ю.Ю. и др. Организация доклинических исследований бактерицидного и ранозаживляющего действия импульсного фототерапевтического аппарата "Заря" // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. – 2021. – Т. 29, № 5. – С. 1156-1162.
3. Чудных С.М., Абдувосидов Х.А., Чекмарева И.А., Егоров В.С. Эффективность местного лечения хронически ран в комбинации с импульсным высокоинтенсивным оптическим облучением // Тверской медицинский журнал. – 2023. – № 4. – С. 29-32.
4. Шестакова В.Г., Банин В.В., Баженов Д.В. Морфометрия и математическое моделирование регенераторного процесса полнослойной раны кожи при стимулированном ангиогенезе // Медицинская наука и образование Урала. – 2022. – Т. 23, № 1. – С. 200-203.
5. Alcolea J.M., Hernández E., Martínez-Carpio P.A., et al. Treatment of Chronic Lower Extremity Ulcers with a New Er: Yag Laser Technology // Laser Ther. – 2017. – V. 26, N 3. – P. 211-222.
6. Aleksandrowicz H, Owczarczyk-Saczonek A, Placek W. Venous Leg Ulcers: Advanced Therapies and New Technologies // Biomedicines. – 2021. – V. 9, N 11. – doi:10.3390/biomedicines9111569.
7. Narita K., Asano K., Morimoto Y., et al. Disinfection and healing effects of 222-nm UVC light on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in mouse wounds // J Photochem Photobiol B. – 2018. - V. 178. – P. 10-18.
8. Rhea L, Dunnwald M. Murine Excisional Wound Healing Model and Histological Morphometric Wound Analysis // J Vis Exp. – 2020. – V. 162. – doi:10.3791/61616.
9. Wang D, Kuzma ML, Tan X, et al. Phototherapy and optical waveguides for the treatment of infection // Adv Drug Deliv Rev. – 2021. – V. 179. – doi:10.1016/j.addr.2021.114036.