

А.В. БУРАВСКИЙ, Е.В. БАРАНОВ, С.И. ТРЕТЬЯК, М.К. НЕДЗЬВЕДЬ

## ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЛОКАЛЬНОЙ СВЕТОДИОДНОЙ ФОТОТЕРАПИИ НА ТЕЧЕНИЕ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»,  
Республика Беларусь

**Цель.** Оценить влияние локальной светодиодной фототерапии на течение раневого процесса в эксперименте.

**Материал и методы.** Исследование выполнялось на 102 беспородных белых крысах с экспериментальными гнойными (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) ранами (шесть подгрупп по 17 животных в каждой). В обеих подгруппах контрольной группы лечение не проводилось. В 1 и 2 подгруппах основной группы применялась системная антибиотикотерапия, в подгруппах 3 и 4 (без антибиотикотерапии) последовательно использовались методы локальной светодиодной фототерапии: антимикробное фотодинамическое воздействие с фотосенсибилизатором «Мазь Фотолон» и длиной волны излучения  $\lambda_1 = (0,405 \pm 0,02)$  мкм, а также фоторегуляторное воздействие с  $\lambda_2 = (0,630 \pm 0,03)$  мкм. Выводы о влиянии локальной светодиодной фототерапии на течение раневого процесса делали на основании сравнения результатов визуального наблюдения, компьютерной планиметрии, гистологического и микробиологического исследования в группах.

**Результаты.** Локальное применение неполяризованного светодиодного излучения с  $\lambda_1 = (0,405 \pm 0,02)$  мкм и лекарственного средства «Мазь Фотолон» приводило к наиболее значимому снижению общего микробного числа раневых биотопов в короткие сроки, а также завершению первой фазы раневого процесса к 7 суткам от начала эксперимента. Использование локального фоторегуляторного воздействия после окончания фазы воспаления (поляризованное светодиодное излучение с  $\lambda_2 = (0,630 \pm 0,03)$  мкм) вызывало стимуляцию раневых репаративных процессов – ускорение контракции раны за счет активизации роста и созревания грануляционной ткани, а также усиление краевой эпителизации.

**Заключение.** В условиях эксперимента *in vivo* использование локальной светодиодной фототерапии с выбранными параметрами с учетом фазы раневого процесса приводило к сокращению не менее чем на 5 суток сроков заживления гнойных ран. Полученные результаты могут служить ориентиром в разработке методов лечения для клинического применения.

*Ключевые слова:* светодиодное излучение, фототерапия, фотосенсибилизатор, раневой процесс, эпителизация, грануляционная ткань

**Objectives.** To evaluate the effects of local light-emitting diode phototherapy (LED) on experimental wounds.

**Methods.** The study was performed on 102 white inbred rats with experimental purulent (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) wounds (6 subgroups with 17 animals in each). The rats in both control subgroups were not treated. Systemic antibiotic therapy was applied in the first and second subgroups of the main group; in the subgroups three and four of the main group (without antibiotic therapy) the local LED phototherapy were used sequentially: at first the antimicrobial photodynamic therapy with “Ointment Photolon” photosensitizer and emission wavelength  $\lambda_1 = (0,405 \pm 0,002)$   $\mu\text{m}$  was applied, then the photoregulation by  $\lambda_2 = (0,630 \pm 0,03)$   $\mu\text{m}$  was used. Conclusion about the impact of the local LED phototherapy on experimental wounds healing was made by comparing the results of visual observation, computer planimetry, histological and microbiological investigations in groups.

**Results.** The local application of unpolarized LED light  $\lambda_1 = (0,405 \pm 0,002)$   $\mu\text{m}$  and medicinal agent «Ointment Photolon» led to the most significant reduction of the total wound microorganisms number in a short term, and the completion of the first phase of wound healing process by the seventh day of experiment. Stimulation of wound reparative processes was caused by local use of polarized LED phototherapy  $\lambda_2 = (0,630 \pm 0,03)$   $\mu\text{m}$  after the inflammatory phase; this results in the activation of growth and maturation of granulation tissue formation as well as intensification of the epithelialization occurred from the edges of the wound.

**Conclusion.** The use of the local LED phototherapy with the selected parameters, taking into account the phase of experimental wound healing process resulted in the term reduction of healing no less than 5 days *in vivo*. The obtained results are considered to use a guide intended to develop treatment methods for designing clinical practice.

*Keywords:* light-emitting diode radiation, phototherapy, photosensitizer, wound process, epithelialization, granulation tissue

Novosti Khirurgii. 2015 Nov-Dec; Vol 23 (6): 601-611

Evaluation of Effect of Local Light-Emitting Diode Phototherapy on Experimental Wounds

A.V. Buravsky, E.V. Baranov, S.I. Tretyak, M.K. Nedzved

## Введение

Эволюция представлений о патофизиологии раневого процесса и общих принципах лечения гнойной хирургической патологии насчитывает не одно столетие. Внедрение в медицинскую практику методов асептики и антисептики, использование антибиотикотерапии, местное применение лекарственных средств разной направленности и современных раневых покрытий, а также ряда других методов лечения, считающихся на сегодняшний день традиционными, позволило существенно улучшить клинические результаты. Однако и в настоящее время проблема лечения пациентов с раневыми дефектами и хирургическими инфекциями кожи и мягких тканей не теряет актуальности и социально-экономической значимости. Это обусловлено как увеличением количества полирезистентных штаммов микроорганизмов, так и ростом частоты встречаемости у профильных пациентов сопутствующей патологии, негативно влияющей на раневую репаративный потенциал, а в ряде случаев – недостаточной эффективностью применяемых методов лечения [1, 2].

Одним из перспективных направлений исследований является изучение возможностей применения различных вариантов локальной фототерапии (ФТ) для местного лечения ран [3, 4, 5]. С точки зрения механизмов реализации биологических эффектов и результатов фотовоздействия следует четко отличать два принципиально разных способа ФТ: антимикробную фотодинамическую терапию (АФДТ) и фоторегуляторную терапию (ФРТ). Локальная АФДТ, которая может быть использована в течение фазы воспаления, основана на применении экзогенных фотосенсибилизаторов (ФС) и различных видов излучения (когерентное и некогерентное) и направлена на подавление раневой микрофлоры [6, 7, 8]. Методика локальной фоторегуляторной терапии (ФРТ) предусматривает использование лазерного и/или линейного поляризованного некогерентного излучения (без ФС) для стимуляции репаративной регенерации и, как правило, применяется во второй и третьей фазах раневого процесса [9, 10].

В современной литературе достаточно много информации об использовании различных вариантов излучения видимого и ближнего инфракрасного спектральных диапазонов для улучшения условий заживления раневых дефектов – как в направлении элиминации раневой микрофлоры, так и в плане стимуляции раневых репаративных процессов [3, 4, 5, 7]. Однако, несмотря на отдельные совпаде-

ния взглядов, в публикациях разных авторов нередко фигурируют противоречивые данные, особенно в отношении параметров и режимов воздействия, а сведения об использовании светодиодного излучения для локальной фототерапии ран встречаются крайне редко.

Представленные выше положения свидетельствуют о необходимости проведения дальнейших исследований по изучению влияния светодиодного света с различными физическими параметрами на жизнедеятельность патогенных микроорганизмов раневых биотопов, клеточную и тканевую регенерацию кожи и мягких тканей.

**Цель** исследования: оценить влияние локальной светодиодной фототерапии на течение раневого процесса в эксперименте.

## Материал и методы

Для проведения экспериментов в качестве источника светодиодного излучения был использован комплекс фототерапевтический «Календула», светодиодная матрица которого позволяет получить монохроматическое светодиодное излучение с длинами волн  $\lambda_1=(0,405\pm 0,02)$  мкм и  $\lambda_2=(0,630\pm 0,03)$  мкм и обеспечивает достаточно широкий диапазон плотностей энергии облучения (ГНУ «Институт физики им. Б.И. Степанова» НАН Беларуси, НПК «Люзар») [11]. В качестве фотосенсибилизатора был выбран препарат «Фотолон» [12] в лекарственной форме «Мазь Фотолон» (РУП «Белмедпрепараты»).

Исследование выполнялось на 102 белых беспородных лабораторных крысах стадного разведения массой тела 180-200 г, которые содержались в отдельных вольерах в стандартных условиях вивария (температура воздуха в боксе 18-20°C при относительной влажности 55%) со свободным доступом к пище и воде. Эксперименты *in vivo* проводились в строгом соответствии с этическими нормами обращения с животными, с соблюдением рекомендаций «Всемирного общества защиты животных» (WSPA) и требований «Европейской конвенции по защите экспериментальных животных» (Страсбург, 1986 г.), а также в соответствии с «Положением о порядке использования экспериментальных животных в научно-исследовательских работах и учебном процессе в Белорусском государственном медицинском университете», утвержденным Ученым Советом БГМУ (протокол №7 от 31.08.2006 г.).

**Контрольная группа** (n=34) включала следующие подгруппы:

1. Экспериментальные животные, кото-

рым выполнялось моделирование гнойной раны (*S. aureus*) без последующего использования антибактериальной терапии;

2. Экспериментальные животные, которым выполнялось моделирование гнойной раны (*Ps. aeruginosa*) без последующего использования антибактериальной терапии.

Основную группу (n=68) составили следующие подгруппы:

1. Экспериментальные животные, которым выполнялось моделирование гнойной раны (*S. aureus*) с использованием, начиная с 3 суток, ежедневного внутримышечного введения антибиотика – по 12 сутки эксперимента включительно;

2. Экспериментальные животные, которым выполнялось моделирование гнойной раны (*Ps. aeruginosa*) с использованием, начиная с 3 суток, ежедневного внутримышечного введения антибиотика – по 12 сутки эксперимента включительно;

3. Экспериментальные животные, которым выполнялось моделирование гнойной раны (*S. aureus*) без последующего использования антибактериальной терапии; с 3 по 7 сутки наблюдения включительно ежедневно проводилось локальное антимикробное фотовоздействие (всего 5 сеансов); далее с 8 по 12 сутки эксперимента включительно ежедневно проводилось локальное фоторегуляторное воздействие (всего 5 сеансов);

4. Экспериментальные животные, которым выполнялось моделирование гнойной раны (*Ps. aeruginosa*) без последующего использования антибактериальной терапии; с 3 по 7 сутки наблюдения включительно ежедневно проводилось локальное антимикробное фотовоздействие (всего 5 сеансов); далее с 8 по 12 сутки эксперимента включительно ежедневно проводилось локальное фоторегуляторное воздействие (всего 5 сеансов).

В подгруппах контрольной группы, а также в первой и второй подгруппах основной группы локальное светодиодное фотовоздействие не выполнялось. В подгруппах лабораторных животных, получавших антибиотикотерапию, использовали внутримышечное введение гентамицина сульфата в дозировке не более 3 мг/кг/сутки (приблизительно 0,5 мг в сутки на 1 крысу).

#### Методика моделирования экспериментальной гнойной раны

В условиях соблюдения правил асептики и антисептики после внутрибрюшинного введения 0,5-0,7 мл 1% раствора тиопентала натрия (из расчета 40-60 мг/кг), экспозиции 15-20

минут и фиксации крысы на спине животного выбривали участок кожи размерами 3×3 см. На депилированной коже крысы раствором бриллиантового зеленого намечали контур будущей раны: окружность диаметром 2,5 см. Кожу обрабатывали дважды антисептиком «Йодонат». Наносили рану округлой формы номинальным диаметром 2,5 см, иссекая кожу, подкожную клетчатку и фасцию до мышц. Затем дно и края раневого дефекта инфицировали путем инъекций монокультуры, суспендированной в 0,9% водном растворе хлорида натрия до  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл (концентрация определялась по стандарту мутности). Использовались 24-часовые монокультуры эталонных штаммов микроорганизмов *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15412, которые являются типичными представителями грамположительной и грамотрицательной флоры соответственно. Объем вводимой взвеси составлял 2 мл. Раневой дефект укрывали стерильным прозрачным раневым покрытием, которое снижало вероятность контаминации раны извне, а также обеспечивало адекватный влаго- и газообмен. Через 2 суток раны имели характерные признаки гнойного воспаления – серозно-гнойное отделяемое, налеты фибрина, небольшой перифокальный отек и пастозность тканей (рис. 1).

#### Методика проведения локального антимикробного фотовоздействия

В экспериментах *in vivo* после фиксации лабораторного животного на столике в затемненном помещении на поверхность раневого дефекта наносилась «Мазь Фотолон» (из расчета 0,3 мл на 1 см<sup>2</sup>), которая распределялась тонким слоем по поверхности раны. Экспозиция

Рис. 1. Внешний вид экспериментальной раны через 2 суток после инфицирования



ФС составляла 30 минут. Затем излишки фотосенсибилизатора удалялись салфеткой. Производилось локальное антимикробное фотодинамическое воздействие (АФДВ) с применением неполяризованного светодиодного излучения (НСИ) с длиной волны  $\lambda_1=(0,405\pm 0,02)$  мкм. Плотность энергии облучения (ПЭО) составляла  $20\pm 5$  Дж/см<sup>2</sup> за один сеанс.

### Методика проведения локального фоторегуляторного воздействия

После фиксации лабораторного животного на столике и удаления раневого покрытия производилось локальное фоторегуляторное воздействие (ФРВ) с применением поляризованного светодиодного излучения (ПСИ) с длиной волны  $\lambda_2=(0,630\pm 0,03)$  мкм. ПЭО составляла  $10\pm 5$  Дж/см<sup>2</sup> за один сеанс.

### Методика проведения микробиологического исследования

Взятие материала для микробиологического исследования производили с помощью желатиновых тампонов с поверхности экспериментальной раны. В желатиновые тампоны перед посевом добавляли 0,9 мл физиологического раствора (разведение 1:10) и расплавляли при 37°, готовили разведения (1:100; 1:1000). Каждое разведение высевали по 0,02 мл и 0,1 мл на плотные питательные среды: мясо-пептонный агар, желточно-солевой агар (*Staphylococcus*) и среду Левина (*Pseudomonas*). Чашки со средами инкубировали в термостате 24 часа при 37°C. Количество микроорганизмов в 1 мл определяли по формуле: для посевов 0,02 мл:  $N=\text{количество м/о общее}\times 50\times 10^n$ ;

для посевов 0,1 мл:  $N=\text{количество м/о общее}\times 10\times 10^n$ , где  $10^n$  — степень разведения с обратным знаком.

### Методика проведения планиметрического исследования

После фотосъемки раны цифровой камерой Canon PowerShot A460 (China) с наличием в кадре единицы длины полученное изображение импортировалось в компьютер. Для обработки графической информации применялся анализатор изображения Universal Desktop Ruler v3.3.3269, выполнялось измерение площади раневой поверхности (рис. 2).

Данные компьютерной планиметрии использовали для изучения объективных показателей динамики заживления экспериментальных ран. Расчет уменьшения площади ран ( $\Delta S$ , %) за определенный период наблюдения производился по формуле:

$$\frac{(S_0 - S_n) \times 100\%}{S_0}$$

где  $S_0$  — исходная площадь раны,  $S_n$  — площадь раны на n-е сутки.

День моделирования экспериментальной раны считали первыми сутками эксперимента во всех случаях. Микробиологические и планиметрические исследования, а также визуальная оценка состояния выполнялись ежедневно с 3 по 12 сутки эксперимента, а также на 14, 21 и 28 сутки. При проведении антимикробного фотодинамического воздействия забор и посев материала выполняли как до, так и после облучения. Поэтапное выведение крыс

Рис. 2. Интерфейс программы Universal Desktop Ruler v3.3.3269



контрольных и основных подгрупп из эксперимента (с последующим гистоморфологическим изучением препаратов) проводили на 4, 7, 10, 14, 21 и 28 сутки.

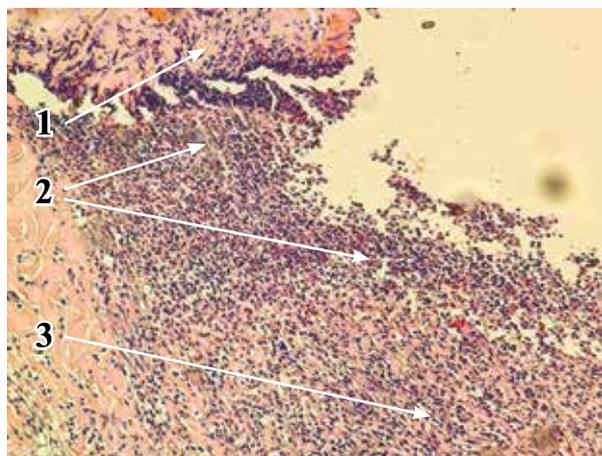
Выводы о влиянии локальной светодиодной фототерапии на течение раневого процесса делали на основании сравнительной оценки результатов подгрупп основной и контрольной групп. Анализировали данные визуального наблюдения, компьютерной планиметрии (показатели изменения площадей раневых дефектов  $\Delta S$  в процессе эксперимента) и микробиологического исследования в динамике.

Статистическая обработка результатов исследования была выполнена с использованием непараметрических методов. Данные представлены в виде медиана и квартилей —  $Me(Q_{25}; Q_{75})$ . Для сравнения независимых выборок применяли метод Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis test) и U-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test). Для оценки взаимосвязи количественных признаков применяли метод корреляционного анализа Спирмена (Spearman Rank Order Correlations). Различия считали статистически значимыми при вероятности безошибочного прогноза не менее 95% ( $p < 0,05$ ).

### Результаты

В течение первых 3-4-х суток эксперимента во всех подгруппах фактические площади раневых дефектов были больше номинальных и в большинстве случаев составляли 6,5-7,5 см<sup>2</sup>. Вероятно, это было связано с мобильностью кожи на спине крысы, деформацией ран и развитием гистоморфологических из-

**Рис. 3.** Рана животного контрольной группы на 14 сутки эксперимента. 1 — уплотненная плазма (белок), 2 — погибающие нейтрофилы, 3 — молодая грануляционная ткань. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 100$



менений в фазу воспаления. Сопоставление площадей раневых дефектов на 4 сутки эксперимента не выявило статистически значимых различий между группами ( $p < 0,05$ ), что имело большое значение для последующей объективной интерпретации полученных данных.

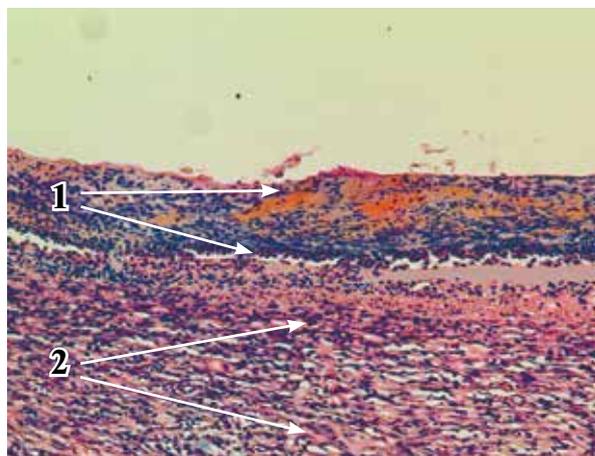
В первой и второй подгруппах контрольной группы на 14 сутки эксперимента раневые дефекты были покрыты слоем погибающих нейтрофилов, под которым находилась молодая грануляционная ткань с немногочисленными беспорядочно расположенными коллагеновыми волокнами (рис. 3).

К 28 суткам эксперимента площади раневых дефектов у животных этих подгрупп уменьшились на 60,0 (56,0;62,0)% и 55,9 (54,1;58,9)% соответственно по отношению к исходным. При гистологическом исследовании под струпом определялась грануляционная ткань с мелкими очагами фибриноидных некрозов, умеренным количеством клеток и коллагеновыми волокнами, принимающими горизонтальное положение. Заживление раневых дефектов наступило к 43-45 суткам эксперимента.

У животных первой и второй подгрупп основной группы на 14 сутки эксперимента поверхность раны была представлена гнойно-некротическими массами, под которыми определялся тонкий неравномерный слой созревающей грануляционной ткани (рис. 4).

К 28 суткам эксперимента площади ран у животных первой и второй подгрупп основной группы уменьшились на 73,2 (68,1;75,0)% и 68,1 (67,1;72,6)% соответственно по отношению к исходным. При гистологическом исследовании в области краев раневых дефектов определялась эпителизация. Поверхности ран

**Рис. 4.** Рана животного первой (второй) подгруппы основной группы на 14 сутки эксперимента. 1 — гнойно-некротический детрит, 2 — созревающая грануляционная ткань. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 100$



были представлены созревающей соединительной тканью, в которой определялось умеренное количество горизонтально ориентированных коллагеновых волокон, фибробластов и макрофагов. Полное заживление было зафиксировано на 38-40 сутки эксперимента.

В третьей и четвертой подгруппах основной группы на 14 сутки раны были покрыты остатками струпа, под которым проходило неравномерное созревание соединительной ткани с мелкими участками фибриноидных изменений. По краям раневой поверхности было отмечено нарастание многослойного плоского эпителия (рис. 5).

К 28 суткам эксперимента площади раневых дефектов у животных третьей и четвертой подгрупп основной группы уменьшились на 90,1 (86,7;93,0)% и 88,9 (86,7;93,1)% соответственно по отношению к исходным — оставался только небольшой дефект эпителия в центре. В средних и глубоких отделах раны определялась почти зрелая соединительная ткань; в поверхностных отделах под многослойным плоским эпителием сохранялось большое количество клеток и беспорядочно расположенные коллагеновые волокна. Экспериментальные раны зажили на 32-33 сутки эксперимента.

Сравнение данных визуального наблюдения позволило выявить различия макроско-

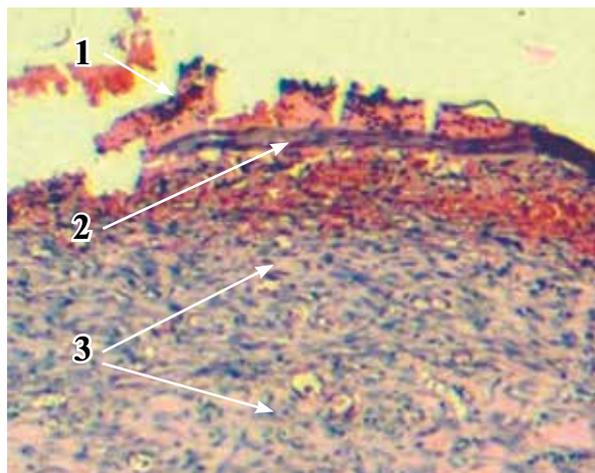


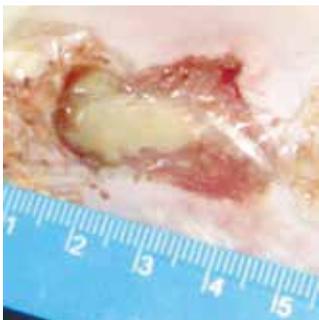
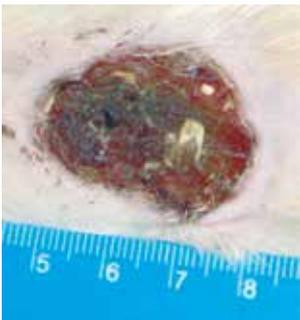
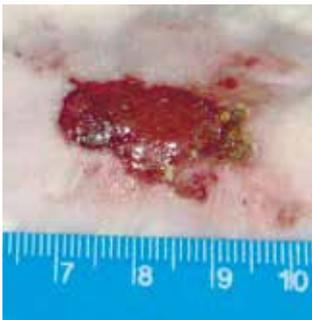
Рис. 5. Рана животного третьей подгруппы основной группы на 14 сутки эксперимента. 1 — остатки струпа, 2 — краевая эпителизация, 3 — созревающая соединительная ткань. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 100$

пической динамики заживления раневых дефектов в подгруппах контрольной и основной групп (таблица 1).

Визуально в обеих подгруппах контрольной группы (гнойные раны без лечения) картина активного гнойного процесса наблюдалась до 14 суток эксперимента включительно, однако по данным гистологического исследования первая фаза раневого процесса продолжалась не менее 21 суток. На фоне применения си-

Таблица 1

**Макроскопическая динамика состояния раневых дефектов**

Группа Подгруппа	Контрольная		Основная	
	Первая и вторая		Первая и вторая	Третья и четвертая
14				
28				

Сутки эксперимента

стемной антибиотикотерапии (первая и вторая подгруппы основной группы) макроскопические признаки гнойного воспаления раневых дефектов исчезали к 8-10 суткам эксперимента, далее заживление проходило под струпом. Однако результаты гистологического исследования показали, что фаза воспаления заканчивалась только к 14 суткам эксперимента. Таким образом, в вышеуказанных подгруппах визуальные макроскопические характеристики раневых дефектов и околораневых тканей не соответствовали данным гистологического исследования препаратов в контрольные сроки наблюдения. Поэтому в оценке продолжительности первой фазы раневого процесса отдавали предпочтение морфологическим признакам.

В третьей и четвертой подгруппах основной группы (гнойные раны, локальная светодиодная фототерапия) к 7 суткам эксперимента исчезали макроскопические признаки гнойного воспаления, и на поверхности раневых дефектов формировался плотный струп; дальнейшее заживление проходило под струпом. Результаты гистологического исследования в этих подгруппах соответствовали данным визуального наблюдения.

Сравнительный анализ показателей  $\Delta S$  позволил выявить существенные различия динамики площадей раневых дефектов у животных основной и контрольной групп (таблица 2).

Таким образом, результаты, полученные в третьей и четвертой подгруппах основной группы (гнойные раны, локальное светодиодное фотозодействие), были больше показа-

телей любой другой экспериментальной подгруппы (во всех случаях  $p < 0,05$ ) в контрольные сроки эксперимента (исключение – отсутствие значимых различий между данными первой и четвертой подгрупп основной группы на 7 сутки эксперимента при парном сравнении с учетом поправки Бонферрони  $p = 0,1$ ). Значения  $\Delta S$  первой и второй подгрупп основной группы (гнойные раны, системная антибиотикотерапия) достоверно превышали (во всех случаях  $p = 0,00$ ) соответствующие результаты обеих подгрупп контрольной группы (гнойные раны без лечения).

Анализ данных микробиологического исследования в экспериментальных подгруппах проводили с использованием Kruskal-Wallis test, по результатам которого дополнительно применили Mann-Whitney U-test с поправкой Бонферрони. При парном сравнении на 3 сутки эксперимента значимых различий между подгруппами (за исключением второй подгруппы контрольной группы – во всех случаях  $p < 0,05$ ) выявлено не было. Однако, начиная с 4-5 суток по 21 сутки эксперимента включительно, показатели микробного роста в подгруппах основной группы были достоверно меньше (во всех случаях  $p < 0,05$ ) величин общего микробного числа (ОМЧ) контрольной группы (таблица 3).

В третьей и четвертой подгруппах основной группы с 3 по 7 сутки включительно проводилось АФДВ. Сопоставление показателей микробного роста в этих подгруппах до и после АФДВ эксперимента позволило оценить эффективность антимикробного фотодинами-

Таблица 2

**Значения  $\Delta S$  в экспериментальных подгруппах в динамике**

Группа, подгруппа		Уменьшение площадей раневых дефектов $\Delta S$ , % – Me( $Q_{25}; Q_{75}$ )			
		Сутки эксперимента			
		7	14	21	28
Контрольная	Первая	8,0 (6,7;8,8)	26,0 (23,9;27,5)	40,3 (37,7;45,3)	60,0 (56,0;62,0)
	Вторая	5,8 (5,3;8,1)	20,5 (20,0;24,3) * $p=0,03$	34,8 (30,4;38,4) * $p=0,03$	55,9 (54,1;58,9)
Основная	Первая	15,1 (13,4;16,0) ** $p=0,00$	38,8 (37,7;43,7) ** $p=0,00$	56,0 (53,5;56,7) ** $p=0,00$	73,2 (68,1;75,0) ** $p=0,00$
	Вторая	13,5 (12,2;15,3) ** $p=0,00$	38,2 (37,0;39,4) ** $p=0,00$	50,7 (49,3;55,4) ** $p=0,00$	68,1 (67,1;72,6) ** $p=0,00$
	Третья	20,5 (16,9;25,4)	66,2 (59,2;68,1)	80,3 (71,2;81,7)	90,1 (86,7;93,0)
	Четвертая	19,4 (15,9;27,5) * $p=0,00$ ** $p=0,00$ *** $p=0,03$	63,4 (59,7;68,1)	79,2 (71,4;81,7) * $p=0,00$	88,9 (86,7;93,1)
Kruskal-Wallis test		H=53,57 $p=0,000$	H=59,09 $p=0,000$	H=58,86 $p=0,000$	H=57,39 $p=0,000$

Примечание: Mann-Whitney U-test с поправкой Бонферрони: \* – достоверность различий с подгруппой 1 контрольной группы; \*\* – достоверность различий с подгруппой 2 контрольной группы; \*\*\* – достоверность различий с подгруппой 1 основной группы; \*\*\*\* – достоверность различий с подгруппой 2 основной группы; \*\*\*\*\* – достоверность различий с подгруппой 3 основной группы.

Таблица 3

Сутки	Динамика микробного роста в подгруппах						Kruskal-Wallis test	
	Общее микробное число, КОЕ/мл – Me(Q <sub>25</sub> ;Q <sub>75</sub> )							
	Контрольная группа, подгруппы		Основная группа, подгруппы					
	Первая	Вторая	Первая	Вторая	Третья	Четвертая		
3	7,0 (5,0;8,5) ×10 <sup>7</sup>	2,0 (1,0;3,0) ×10 <sup>8</sup> *p=0,00	8,0 (6,0;9,0) ×10 <sup>7</sup> **p=0,01	1,0 (0,7;1,5) ×10 <sup>8</sup>	6,0 (5,0;8,0) ×10 <sup>7</sup> **p=0,00	6,0 (5,0;8,0) ×10 <sup>7</sup> **p=0,00	H=26,67 p=0,000	
4	8,0 (6,0;9,0) ×10 <sup>7</sup>	5,0 (4,0;7,0) ×10 <sup>7</sup> *p=0,04	5,0 (4,0;8,0) ×10 <sup>6</sup> */**p=0,00	5,0 (4,0;7,0) ×10 <sup>7</sup> *p=0,05 ***p=0,00	5,0 (4,0;7,0) ×10 <sup>5</sup> */***p=0,00 ****p=0,00	5,0 (5,0;8,0) ×10 <sup>5</sup> */***p=0,00 ****p=0,00	H=57,21 p=0,000	
5	1,0 (0,8;1,3) ×10 <sup>8</sup>	0,8 (0,8;1,0) ×10 <sup>8</sup>	1,0 (0,8;1,3) ×10 <sup>4</sup> */**p=0,00	4,0 (3,0;5,0) ×10 <sup>6</sup> */**p=0,00	5,0 (5,0;7,5) ×10 <sup>3</sup> */***p=0,00 ****p=0,00	5,0 (5,0;7,5) ×10 <sup>5</sup> */***p=0,00 ****p=0,00 ****p=0,00	H=60,74 p=0,000	
6	7,0 (6,0;9,0) ×10 <sup>7</sup>	1,0 (0,8;1,3) ×10 <sup>8</sup>	7,0 (5,0;9,0) ×10 <sup>2</sup> */**p=0,00	2,0 (1,5;4,0) ×10 <sup>3</sup> */**p=0,00	4,0 (3,0;6,0) ×10 <sup>2</sup> */**p=0,00 ****p=0,00	5,0 (1,5;7,0) ×10 <sup>4</sup> */***p=0,00 ****p=0,00 ****p=0,00	H=60,77 p=0,000	
7	7,0 (6,0;8,5) ×10 <sup>7</sup>	5,0 (4,0;7,0) ×10 <sup>7</sup>	8,0 (7,0;8,5) ×10 <sup>1</sup> */**p=0,00	5,0 (3,5;7,0) ×10 <sup>1</sup> */**p=0,00	4,0 (0,1;5,0) ×10 <sup>1</sup> */***p=0,00	3,0 (2,0;5,0) ×10 <sup>2</sup> */***p=0,00 ****p=0,00 ****p=0,00	H=58,12 p=0,000	
8	8,0 (6,0;9,0) ×10 <sup>7</sup>	3,5 (2,0;6,0) ×10 <sup>7</sup> *p=0,03	0,7 (0,3;0,8) ×10 <sup>1</sup> */**p=0,00	3,5 (2,0;6,0) ×10 <sup>1</sup> */***p=0,00	4,0 (3,0;7,0) ×10 <sup>1</sup> */***p=0,00	5,0 (4,0;7,0) ×10 <sup>1</sup> */***p=0,00	H=53,32 p=0,000	
9	5,0 (4,0;7,0) ×10 <sup>7</sup>	5,0 (4,0;7,0) ×10 <sup>7</sup>	5,0 (4,0;7,0) ×10 <sup>1</sup> */**p=0,00	5,0 (3,5;6,0) ×10 <sup>2</sup> */***p=0,00	6,0 (4,0;9,0) ×10 <sup>2</sup> */***p=0,00	6,0 (4,0;8,0) ×10 <sup>2</sup> */***p=0,00	H=54,93 p=0,000	
10	5,0 (4,0;7,0) ×10 <sup>7</sup>	1,0 (0,6;3,5) ×10 <sup>7</sup>	1,0 (0,7;1,4) ×10 <sup>2</sup> */**p=0,00	1,0 (0,5;1,7) ×10 <sup>3</sup> */***p=0,00	0,8 (0,3;1,0) ×10 <sup>3</sup> */***p=0,00	0,8 (0,3;1,0) ×10 <sup>3</sup> */***p=0,00	H=55,66 p=0,000	
11	3,0 (2,0;3,5) ×10 <sup>7</sup>	1,0 (0,5;2,5) ×10 <sup>7</sup>	4,5 (3,0;8,0) ×10 <sup>2</sup> */**p=0,00	1,2 (0,8;2,0) ×10 <sup>3</sup> */**p=0,00 ***p=0,05	5,0 (3,0;7,0) ×10 <sup>1</sup> */***p=0,00 ****p=0,00	1,0 (0,5;2,0) ×10 <sup>3</sup> */**p=0,00 ****p=0,00	H=57,19 p=0,000	
12	0,6 (0,2;1,0) ×10 <sup>7</sup>	0,8 (0,3;1,0) ×10 <sup>7</sup>	1,0 (0,5;2,0) ×10 <sup>3</sup> */**p=0,00	0,9 (0,3;2,0) ×10 <sup>3</sup> */**p=0,00	5,0 (3,0;7,0) ×10 <sup>1</sup> */***p=0,00 ****p=0,00	0,9 (0,2;1,0) ×10 <sup>3</sup> */**p=0,00 ****p=0,00	H=54,73 p=0,000	
14	3,0 (2,0;4,0) ×10 <sup>5</sup>	4,0 (3,0;5,0) ×10 <sup>6</sup> *p=0,00	0,8 (0,5;1,0) ×10 <sup>3</sup> */**p=0,00	4,0 (3,0;5,0) ×10 <sup>2</sup> */**p=0,00	1,0 (0,5;1,5) ×10 <sup>2</sup> */***p=0,00 ****p=0,00	7,0 (4,0;8,0) ×10 <sup>2</sup> */**p=0,00 ****p=0,00	H=55,83 p=0,000	
21	0,5 (0,3;1,5) ×10 <sup>4</sup>	3,0 (2,0;5,0) ×10 <sup>3</sup>	0,5 (0,3;1,0) ×10 <sup>3</sup> */**p=0,00	5,0 (3,5;6,0) ×10 <sup>2</sup> */**p=0,00	2,0 (1,0;3,0) ×10 <sup>2</sup> */**p=0,00 ***p=0,01 ****p=0,00	3,0 (2,5;5,0) ×10 <sup>2</sup> */**p=0,00	H=50,05 p=0,000	
28	0,8 (0,5;1,3) ×10 <sup>2</sup>	5,0 (3,0;8,0) ×10 <sup>2</sup> *p=0,00	0,7 (0,5;1,0) ×10 <sup>2</sup> **p=0,00	1,0 (0,5;1,5) ×10 <sup>2</sup> **p=0,00	5,0 (0,1;8,0) ×10 <sup>1</sup> **p=0,00	5,0 (3,0;8,0) ×10 <sup>1</sup> **p=0,00	H=33,69 p=0,000	

Примечание: 1 – в подгруппах 3 и 4 основной группы на 3–7 сутки эксперимента включительно приведены результаты микробиологического исследования материала, взятого до проведения локального антимикробного фотодинамического воздействия

Примечание: 2 – Mann-Whitney U-test с поправкой Бонферрони: \* – достоверность различий с подгруппой 1 контрольной группы; \*\* – достоверность различий с подгруппой 2 контрольной группы; \*\*\* – достоверность различий с подгруппой 1 основной группы; \*\*\*\* – достоверность различий с подгруппой 2 основной группы; \*\*\*\*\* – достоверность различий с подгруппой 3 основной группы

Динамика микробного роста и эффективность антимикробного фотодинамического воздействия в подгруппах основной группы

Сутки	Me(Q <sub>25</sub> ;Q <sub>75</sub> )			
	Подгруппа 3		Подгруппа 4	
	ОМЧ	Rf	ОМЧ	Rf
3 до АФДВ	6,0 (5,0;8,0)×10 <sup>7</sup>	4,3 (3,9;4,7)	6,0 (5,0;8,0)×10 <sup>7</sup>	3,7 (3,5;3,8)
после АФДВ	3,0 (1,5;6,0)×10 <sup>3</sup>		1,1 (0,8;2,0)×10 <sup>4</sup>	
4 до АФДВ	5,0 (4,0;7,0)×10 <sup>5</sup>	3,6 (3,5;3,9)	5,0 (5,0;8,0)×10 <sup>5</sup>	2,6 (2,2;2,8)
после АФДВ	1,0 (0,8;2,0)×10 <sup>2</sup>		2,0 (1,3;4,0)×10 <sup>3</sup>	
5 до АФДВ	5,0 (5,0;7,5)×10 <sup>3</sup>	2,4 (1,9;2,7)	5,0 (5,0;7,5)×10 <sup>5</sup>	2,1 (2,0;2,3)
после АФДВ	2,0 (1,0;7,0)×10 <sup>1</sup>		4,0 (2,5;6,0)×10 <sup>3</sup>	
6 до АФДВ	4,0 (3,0;6,0)×10 <sup>2</sup>	1,6 (1,3;1,8)	5,0 (1,5;7,0)×10 <sup>4</sup>	1,9 (1,9;2,1)
после АФДВ	1,0 (0,5;2,0)×10 <sup>1</sup>		4,0 (2,0;7,0)×10 <sup>2</sup>	
7 до АФДВ	4,0 (0,1;5,0)×10 <sup>1</sup>	1,5 (0;1,7)	3,0 (2,0;5,0)×10 <sup>2</sup>	1,5 (1,4;1,7)
после АФДВ	Роста нет		1,0 (0,5;1,5)×10 <sup>1</sup>	

ческого воздействия посредством вычисления коэффициентов редукции Rf (таблица 4).

Анализ экспериментальных данных с использованием метода Спирмена выявил наличие статистически значимой ( $p=0,000$  во всех случаях) сильной прямой корреляционной связи между значением коэффициента редукции (Rf) и показателями микробного роста (ОМЧ) до проведения АФДВ в третьей ( $p=0,929$ ) и четвертой ( $p=0,892$ ) подгруппах.

В обеих подгруппах контрольной группы (гнойные раны без лечения) уменьшение показателей ОМЧ ниже  $10^3$  КОЕ/мл наблюдалось не ранее 21 суток эксперимента. В то же время применение локального светодиодного фотовоздействия (третья и четвертая подгруппы основной группы), равно как и этиотропной системной антибиотикотерапии (первая и вторая подгруппы основной группы), приводили к снижению уровня микробного загрязнения гноyjnych ран до эпидемиологически незначимого уровня ( $<10^3$  КОЕ/мл) на 6-7 сутки эксперимента. Однако динамика количественных показателей микробиологического исследования в подгруппах основной группы была различна и зависела от вида проводимого экспериментального лечения (рис. 5).

Таким образом, применение в качестве метода лечения гноyjnych ран локального антимикробного фотодинамического воздействия приводило к наиболее значимому и раннему снижению общего микробного числа раневых биотопов. После окончания использования АФДВ отмечалось некоторое увеличение количества микроорганизмов в раневых биотопах, однако медианные значения ОМЧ не превышали  $10^3$  КОЕ/мл.

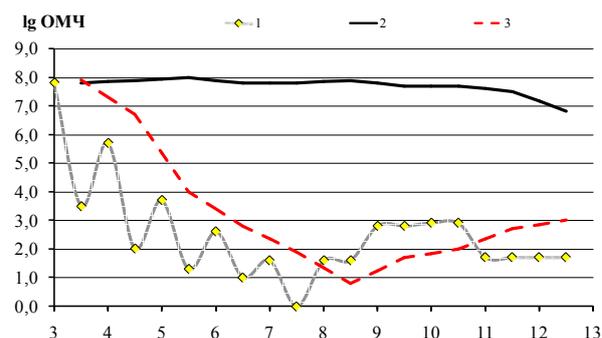
### Обсуждение

В доступной тематической литературе

описание методики комбинированной локальной фототерапии (АФДТ с фотосенсибилизатором в форме мази, а затем ФРТ) раневых дефектов с применением светодиодного излучения встречается в единичных публикациях [7, 10]. Физические параметры излучения – когерентность, длина волны, поляризация, плотность мощности, плотность энергии облучения, а также выбор фотосенсибилизатора и способа его доставки по-прежнему остаются предметом дискуссии и требуют проведения дальнейших исследований, направленных на поиск рациональных методов и улучшение результатов комплексного лечения этой категории пациентов.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) в онкологии направлена на разрушение клеток и тканей. В большинстве случаев это требует использования лазерного излучения красного и ближнего инфракрасного (NIR) диапазонов – длины волн от 600 до 1000-1200 нм, соответствующие области наибольшей прозрачности биоткани, – а также достижения высоких значений ПЭО ( $>100$  Дж/см<sup>2</sup>), что обеспечивает

Рис. 6. Профиль динамики ОМЧ в подгруппах в период 3-12 сутки эксперимента. 1 – антимикробное фотодинамическое воздействие + фоторегуляторное воздействие; 2 – гноyjne раны без лечения; 3 – системная антибиотикотерапия



достаточно глубокую и полную деструкцию опухоли [3, 5, 6].

В хирургии при проведении локальной ФДТ преследуются несколько иные цели. Задачами комбинированной ФТ в комплексном лечении пациентов с раневыми дефектами кожи и мягких тканей являются элиминация патогенной микрофлоры без развития фотодинамического ожога раневого ложа, а также стимуляция собственных раневых репаративных процессов. Поэтому вполне применимо излучение с меньшими длинами волн – 250-700 нм – с величинами ПЭО, не превышающими 30-40 Дж/см<sup>2</sup> [9, 13]. В проведенном исследовании мы руководствовались именно такими подходами, используя по показаниям неполяризованное или поляризованное светодиодное излучение с относительно небольшими расчетными значениями ПЭО. Выбранные параметры и режимы светодиодного фотовоздействия и полученные в исследовании *in vivo* данные соответствуют результатам экспериментов *in vitro*, проведенных ранее [14, 15].

Локальное антимикробное фотодинамическое воздействие с применением НСИ и ФС «Мазь Фотолон», вызывая развитие летальной фотосенсибилизации микроорганизмов раневых биотопов, существенно сокращает продолжительность фазы воспаления в гнойных ранах. Максимальные значения коэффициентов редукции были получены при наиболее высоких исходных уровнях микробной контаминации раневых дефектов независимо от характера микрофлоры.

Локальное фоторегуляторное воздействие с использованием ПСИ вызывает увеличение скорости заживления раневых дефектов за счет стимуляции роста и созревания грануляционной ткани, а также усиления краевой эпителизации.

Дифференцированное и последовательное применение методов локальной светодиодной фототерапии с учетом фазы раневого процесса способствовало сокращению сроков заживления экспериментальных раневых дефектов по отношению к результатам лечения в подгруппах с антибиотикотерапией, а также к контрольной группе (гнойные раны без лечения). Таким образом, биологические эффекты АФДВ и ФРВ на тканевом и организменном уровне реализуются через уменьшение продолжительности и ускорение смены фаз раневого процесса.

### Выводы

1. Гнойные раны без лечения характеризуются продолжительной фазой воспаления (по

данным визуального наблюдения – не менее 14 суток, а по результатам гистологического исследования – не менее 21 суток) и длительным существованием микробного загрязнения с высокими показателями ОМЧ раневых биотопов.

2. Этиотропная системная антибиотикотерапия позволяет в течение 4-5 суток снизить уровень микробной контаминации гнойных ран до эпидемиологически незначимых значений (<10<sup>3</sup> КОЕ/мл). При этом макроскопические признаки фазы воспаления исчезают лишь к 8-10 суткам, а гистологические – к 14 суткам от момента нанесения и инфицирования раны.

Применение локального антимикробного фотодинамического воздействия (1 сеанс в день в течение 5 суток) с использованием неполяризованного светодиодного излучения ( $\lambda_1=(0,405\pm 0,02)$  мкм и ПЭО  $20\pm 5$  Дж/см<sup>2</sup>) и фотосенсибилизатора «Фотолон» в форме мази вызывает более значимое снижение ОМЧ раневых биотопов (независимо от характера флоры) в короткие сроки, а также завершение первой фазы раневого процесса к 7 суткам от начала эксперимента (по данным макроскопического наблюдения и гистологического исследования).

Применение локального фоторегуляторного воздействия ( $\lambda_2=(0,630\pm 0,03)$  мкм и ПЭО  $10\pm 5$  Дж/см<sup>2</sup>, 1 сеанс в день в течение 5 суток) после окончания фазы воспаления стимулирует раневые репаративные процессы – контракцию раны за счет активизации роста и созревания грануляционной ткани, а также краевую эпителизацию.

3. В условиях эксперимента *in vivo* комбинированное пошаговое использование методов локальной светодиодной фототерапии с выбранными параметрами (по отдельности или последовательно) с учетом фазы раневого процесса приводит к сокращению сроков заживления гнойных ран. Полученные результаты могут служить ориентиром в разработке методов лечения для клинического применения.

### Конфликт интересов отсутствует

**Исследование было выполнено сотрудниками 2-й кафедры хирургических болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет» в рамках научно-исследовательских работ по теме «Разработать и освоить в производстве универсальный многоцветный фототерапевтический комплекс на основе светодиодных излучателей высокой мощности (10-40 Вт) для эффективного лечения обширных гнойных и хронических ран, трофических язв. На основе применения данного комплекса разрабо-**

тать и внедрить в медицинскую практику технологии лечения указанных патологий» (ГНТП «Оптиэл», № госрегистрации 20100948, 2009 – 2011 гг.), а также по теме «Разработка клеточных композиций из обонятельного эпителия и кожи для реконструкции эпителиальных дефектов» Программы Союзного государства «Разработка новых методов и технологий восстановительной терапии патологически измененных тканей и органов с использованием стволовых клеток» (№ госрегистрации 20120014, 2011 – 2013 гг.) при участии сотрудников ГНУ «Институт физики им. Б.И. Степанова» НАН Беларуси, НПК «Люзар», ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», а также структурных подразделений УО «Белорусский государственный медицинский университет».

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Абаев Ю. К. Раневая инфекция в хирургии : учеб. пособие / Ю. К. Абаев. – Минск : Беларусь, 2003. – 293 с.
2. Individualized, targeted wound treatment based on the tissue bacterial level as a biological marker / Y. N. Pierpont [et al.] // *Am J Surg.* – 2011 Aug. – Vol. 202, N 2. – P. 220–24. doi: 10.1016/j.amjsurg.2010.09.009.
3. Ищук А. В. Фотодинамическая терапия: история развития метода и его практическое применение в лечении гнойных ран и трофических язв нижних конечностей / А. В. Ищук // *Мед. журн.* – 2007. – № 4. – С. 120–25.
4. Сравнительное исследование действия лазерного и светодиодного излучения на заживление ран и функциональную активность клеток раневого экссудата / Г. И. Клебанов [и др.] // *Биофизика.* – 2005. – Т. 50, № 6. – С. 1137–44.
5. Whinfield A. L. The light revival: Does phototherapy promote wound healing? A review / A. L. Whinfield, I. Aitkenhead // *Foot.* – 2009 Jun. – Vol. 19, N 2. – P. 117–24. doi: 10.1016/j.foot.2009.01.004.
6. Dai T. Photodynamic therapy for localized infections – State of the art / T. Dai, Y. Y. Huang, M. R. Hamblin // *Photodiagnosis Photodyn Ther.* – 2009 Sep-Dec. – Vol. 6, N 3-4. – P. 170–88. doi: 10.1016/j.pdpdt.2009.10.008.
7. Гинюк В. А. Комплексный подход к лечению пациентов с острым парапроктитом с применением фототерапии / В. А. Гинюк // *Новости хирургии.* – 2011. – Т. 19, № 6. – С. 70–75.
8. Странадко Е. Ф. Фотодинамическое воздействие на патогенные микроорганизмы (Современное состояние проблемы антимикробной фотодинамической терапии) / Е. Ф. Странадко, И. Ю. Кулешов, Г. И. Караханов // *Лазер. медицина.* – 2010. – Т. 14, № 2. – С. 52–56.
9. Effect of phototherapy on growth factor levels in neonatal rat skin / T. Soyer [et al.] // *J Pediatr Surg.* – 2011 Nov. – Vol. 46, N 11. – P. 2128–31. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2011.06.012.
10. Yeh N. G. Light-emitting diodes – their potential in biomedical applications / N. G. Yeh, C. H. Wu, T. C. Cheng // *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* – 2010. – Vol. 14, N 8. – P. 2161–66. doi: 10.1016/j.rser.2010.02.015.
11. Комплекс фототерапевтический «Календула» // Каталог высокотехнологичных товаров Республики Беларусь / под ред. А. Г. Шумилина. – Минск : БелИСА, 2014. – Вып. 7. – 232 с.
12. Шляхтин С. В. Возможности и перспективы использования производных хлорофилла для создания эффективных и безопасных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии : обзор литературы / С. В. Шляхтин, Т. В. Трухачева // *Вестн. фармации.* – 2010. – № 2. – С. 1–20.
13. Mbene A. B. DNA damage after phototherapy in wounded fibroblast cells irradiated with 16 J/cm<sup>2</sup> / A. B. Mbene, N. N. Houreld, H. Abrahamse // *J Photochem Photobiol B.* – 2009. – Vol. 94, № 2. – P. 131–37. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2008.11.002.
14. Экспериментальное обоснование эффективности локальной антимикробной фотодинамической терапии (in vitro) / А. В. Буравский [и др.] // *Мед. панорама.* – 2013. – № 4. – С. 10–16.
15. Влияние поляризованного светодиодного излучения на митотическую активность культивированных фибробластов кожи крысы / А. В. Буравский [и др.] // *Мед. панорама.* – 2014. – № 4. – С. 24–28.

#### Адрес для корреспонденции

220116, Республика Беларусь,  
г. Минск, пр. Дзержинского, д. 83,  
УО «Белорусский государственный  
медицинский университет»,  
2-я кафедра хирургических болезней,  
тел. моб. +375 29 622-57-81,  
e-mail: buravskyav@mail.ru,  
Буравский Александр Владимирович

#### Сведения об авторах

Буравский А.В., ассистент 2-й кафедры хирургических болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет».  
Баранов Е.В., к.м.н., доцент 2-й кафедры хирургических болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет».

Третьяк С.И., член-корреспондент НАН Беларуси, д.м.н., профессор, заведующий 2-й кафедрой хирургических болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет».  
Недзьведь М.К., д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии УО «Белорусский государственный медицинский университет».

Поступила 7.10.2015 г.