

На правах рукописи

Григорьев Александр Геннадьевич

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ КРИОКИСЛОРОДНОЙ ТЕРАПИИ
ПРИ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ПРОЦЕССЕ, ВЫЗВАННОМ
ГОСПИТАЛЬНЫМ ПОЛИАНТИБИОТИКО-РЕЗИСТЕНТНЫМ ШТАММОМ
ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА**

14.03.03 – патологическая физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2016

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва» Министерства образования и науки Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук профессор **Власов Алексей Петрович**

Официальные оппоненты:

Моррисон Виталий Викторович

доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры патологической физиологии им. академика А.А. Богомольца ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ

Перетягин Сергей Петрович

доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения экспериментальной медицины ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России» Министерства здравоохранения РФ

Ведущая организация:

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России»

Защита состоится " 22 " декабря 2016 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.06 при Российском университете дружбы народов по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6; сайт: <http://dissovet.rudn.ru>.

Автореферат разослан " ____ " _____ 2016 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 212.203.06

доктор биологических наук, доцент

М.М. Азова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. До настоящего времени одной из важнейших проблем современной хирургии является профилактика и лечение гнойных осложнений и заболеваний. В последние десятилетия благодаря новым лечебным схемам получены существенные успехи в решении этого вопроса (Сажин, В.П. и др., 2010; Блатун Л.А., 2011; Малков И.С. и др., 2012; Гостищев В.К. и др., 2013; Nyldig N. et al., 2016). Важнейшими значимыми компонентами новых лечебных программ являются использование современных схем антибактериальной терапии широкого спектра действия, различных медикаментозных и физиотерапевтических методик, направленных на улучшение трофики тканей, коррекцию гомеостатических расстройств и т.д. (Вафин А.З. и др., 2007; Дербенев В.А., 2010; Паршиков В.В. и др., 2012; Стяжкина С.Н. и др., 2015; Norbury W. et al., 2016). Следует признать, что решение проблемы возможно при гармоничном развитии этих направлений (Ларичев А. Б. и др., 2008; Винник Ю.С. и др., 2011; Доброквашин С.В. и др., 2011; Луцевич, О.Э. и др., 2011; Ousey K. et al., 2016; Whiteside L.A. et al., 2016). В медицине заметный интерес вызывает криотерапия, эффективность которой на инфекционный очаг обусловлена деструктивным действием какого-либо холодого агента на пораженные структуры, а также на сами микроорганизмы (Винник Ю.С. и др., 2008; Аралова М.В., Глухов А.А., 2015).

Определенное место в лечении ряда заболеваний, в том числе гнойно-воспалительного характера, отводится кислородотерапии, в частности озонотерапии и гипербарической оксигенации, при которой даже пораженные ткани полноценно насыщаются кислородом, что улучшает метаболизм (Исаев У.М., 2008; Бабаев Х., Образбаев Ш., 2011; Зубарев П.Н., Рисман Б.В., 2011; Мохов Е. М. и др., 2012).

Несомненный интерес в лечении гнойных ран может вызвать совместное применение этих двух способов терапии. Использование их в хирургии возможно при установлении не только эффективности, но и патогенетических механизмов действия.

Степень разработанности темы. Представленная диссертационная работа основана на исследованиях по изучению воздействия подаваемого под давлением сжиженного кислородного аэрозоля на ткани, поражённые гнойно-деструктивным процессом. Такой способ физико-химического лечебного воздействия на основе сжиженного кислорода ранее в мире не применялся, прежде всего, из-за взрывоопасности. Создан аппарат принципиально новой конструкции (патент РФ № 114837 опубл. 20.04.2012 бюл. № 11 авт. Григорьев А.Г.), позволяющий конденсировать кислород в зоне манипуляционного поля при температуре в диапазоне минус 183-196°С. Оригинальная конструкция аппарата полностью исключает взрывоопасность работы с сжиженным кислородом, что подтверждено испытаниями во Всероссийском научно-исследовательском и испытательном институте медицинской техники (протокол ФГБУ ВНИИИМТ № 14/П-11-266-044 от 10.10.2011 г.). Исходя из изложенного, в диссертационной

работе впервые представлены результаты лечебного эффекта и некоторые патогенетические механизмы нового способа терапии.

Цель исследования. В эксперименте установить эффективность и некоторые механизмы патогенетического действия криокислородной терапии при гнойно-воспалительном процессе мягких тканей.

Задачи исследования:

1. В эксперименте на модели гнойно-воспалительного процесса мягких тканей исследовать течение патологического процесса на местном уровне и проявления системной воспалительной реакции в условиях без лечения и при применении антибактериальной терапии.

2. Оценить течение гнойно-воспалительного процесса на фоне криокислородного воздействия, в том числе в комбинации с антибактериальной терапией.

3. Установить некоторые эффекты патогенетической криокислородной терапии (бактерицидный, иммуномодулирующий, антиоксидантный, ангиопротективный, репаративный) в лечении гнойной

Научная новизна. Показано, что при выбранной экспериментальной модели воспроизводится гнойно-воспалительный процесс мягких тканей такой выраженности, при котором даже на фоне антибактериальной терапии отмечается его прогрессирование с развитием флегмоны и выраженными нарушениями микроциркуляции, резкой активизацией свободно-радикального процесса, угнетением иммунитета.

Впервые установлено, что применение криокислородной терапии в лечении гнойной раны мягких тканей на начальных этапах приводит к ограничению воспалительного очага, а затем к его купированию с выраженными явлениями регенерации тканевых структур. Показано, что включение антибактериального компонента повышает эффективность криокислородной терапии.

Экспериментально доказано, что в основе высокой антибактериальной эффективности криокислородного воздействия при лечении гнойной раны лежит доказанная его высокая бактерицидная активность и иммуномодулирующая способность.

Лабораторно-инструментальными методами исследования выявлено, что одними из механизмов криокислородного воздействия в индукции репаративного потенциала регенерирующих структур гнойной раны является его способность улучшать микроциркуляцию и снижать мембранодестабилизирующие явления за счёт ингибирования процессов перекисного окисления липидов.

Теоретическая и практическая значимость. В эксперименте доказана высокая результативность, установлен ряд патогенетических механизмов действия разработанного способа криокислородной терапии в лечении гнойно-воспалительного процесса мягких тканей, что является веским основанием для его апробации в клинике. Полученные данные могут быть использованы для апробации этого способа и при других патологиях, сопровождающихся воспалительно-некротическими явлениями.

Методология и методы диссертационного исследования. Эффективность и некоторые патогенетические механизмы действия криокислородной терапии изучались комплексно с использованием морфологических, инструментально-биохимических, бактериологических методов. Активность свободно-радикальных процессов изучали методом индуцированной биохемиллюминесценции на БХЛ-07 (Россия, г. Нижний Новгород), микроциркуляция оценивалась методом лазерной доплеровской флоуметрии на комплексе многофункциональной лазерной диагностики «ЛАКК-М» (г. Москва), для определения уровня интерлейкинов использованы наборы eBioscienceRatIL-2 PlatinumELISA и eBioscienceRatIL-4 PlatinumELISA.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедре на кафедре факультетской хирургии Медицинского института федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева» Минобрнауки РФ.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанный способ криокислородной терапии обладает высокой эффективностью в купировании гнойно-воспалительного процесса и активизации репаративной регенерации тканей гнойной раны.

2. Антибактериальный эффект криокислородного воздействия при гнойно-воспалительном процессе обусловлен его непрямым бактерицидным действием за счёт модулирования иммунных реакций и изменения биохимических параметров тканевой среды.

3. В восстановлении (повышении) репаративной способности тканей в области раны значимую роль играет способность криокислородной терапии улучшать микроциркуляцию и снижать мембранодестабилизирующие явления.

Степень достоверности. Данное экспериментальное исследование выполнено на белых крысах-самцах породы «Вистар» 6-месячного возраста, при достаточном объёме выборки. Заражение животных проводили клиническим изолятом *S. Aureus* штамм 3904 MRSA, обладающим устойчивостью к большинству антибиотиков. Криокислородный аппарат испытан в Всероссийском научно-исследовательском испытательном институте (протокол испытаний № 14/П-11-266-044 от 10.10.2011). Лабораторно-инструментальные исследования проводили на оборудовании, сертифицированном для данного вида работ, прошедшем поверку и заводскую калибровку. Также применялись методы статистической обработки, полностью соответствующие поставленным задачам.

Апробация результатов работы. Основные результаты работы доложены и обсуждены на 1-й международной научно-практической конференции «Криотерапия в России» (СПб, 2008), Всемирной научно-практической конференции «Опухоли кожи и мягких тканей» (СПб, 2009), на конференции молодых учёных «Медицинская криология» (Н. Новгород, 2009), на Всероссийской научной конференции по ранам при ФГБУ «Институт им. А.В. Вишневского» (М., 2014), на конференции молодых учёных Мордовского государственного университета

(Саранск, 2015), апробация диссертационной работы проводилась на заседании кафедры факультетской хирургии Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарёва» (Саранск 2016).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 9 научных работ, из них 4 в изданиях, рекомендованных ВАК, получен 1 патент.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 134 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы (1-я глава), материалов и методов исследования (2-я глава), результатов собственных исследований (3 и 4-я главы), обсуждения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, который включает 101 отечественный и 132 иностранных источника. Работа содержит 13 таблиц и 26 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось на 115 белых крысах-самцах породы «Вистар» 6-месячного возраста с массой тела 273 ± 35 г. Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к воде и пище, что соответствует нормативам ГОСТа «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ». Опыты на животных выполняли в соответствии с правилами гуманного обращения с животными, регламентированными «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными Приказом МЗ СССР №742 от 13.11.84г. «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и №48 от 23.01.85г. «О контроле за проведением работ с использованием экспериментальных животных». Оперативные вмешательства проводили в стерильных условиях под общим обезболиванием с применением наркотизирующего препарата Нембутал 40 мг/кг, согласно «Руководства по проведению доклинических исследований МЗ и СР ФГБУ Научного центра экспертизы средств медицинского применения М.2012».

Животные распределены на 5 групп:

1 группа (n=25)– контрольная, животные, которым не применялось никакого лечения гнойной раны (БЛ);

2 группа (n=25)–животные, которым в лечении гнойной раны применяли антибиотикотерапию (АБ);

3 группа(n=25)–животные, которым в лечении гнойной раны применяли антибиотикотерапию и криокислородный аэрозоль (АБ+ККА);

4 группа (n=25)– животные, которым в лечении гнойной раны применяли только криокислородный аэрозоль (ККА);

5 группа (n=15)–интактные животные, не подвергавшиеся хирургическому воздействию.

Моделирование гнойной раны проводили после предварительной подготовки операционного поля путем формирования подкожного кармана и участка скальпированной раны размером 4х6 см и введения в подкожный карман фетрового диска, пропитанного суспензией, содержащей 0,5 мл нозокомиального полиантибиотико-резистентного штамма *S. aureus*10⁸, обладающего устойчивостью к ингибиторзащищенным пеницилинам, цефалоспорином, эритромицину, азитромицину, клиндамицину, линкомицину, ванкомицину, оксацилину, имипиему, обладающего умеренной чувствительностью к ципрофлоксацину, пefлосацину, чувствительного к офлоксацину.

Данный способ обеспечил получение модели инфицированной кожной раны с заданной бактериальной обсеменённостью, которая по своим характеристикам максимально приближена к реальному клиническому течению раневого процесса.

Для определения выраженности бактерицидного действия криокислородного лечения произведены бактериологические исследования. С этой целью у исследуемых животных на 3, 5 и 14-е сутки экспериментального исследования изучали уровень микробной обсеменённости кожной раны *S. Aureus*.

Исследование механизмов бактерицидного эффекта криокислородного воздействия произведены в опытах *in vitro*. Устанавливали его воздействие на штамм *S. aureus* в тестовой системе. Для этого чашку с посевом обрабатывали криокислородным аэрозолем в режиме, который использовали в опытах *in vivo*. Контролем служили исследования с «интактным» бактериальным посевом. Посевы инкубировали в термостате при 37°C в течение 24 ч. Оценивали наличие/отсутствие роста бактерий на агаре после термостатирования.

Лечение гнойной раны проводилось с использованием антибиотика пefлоксацин (Абактал®, рег. № 008768/01) в терапевтической дозе 8 мг/кг 1 раз в сутки в течение 5 дней и криокислородного аэрозоля, для чего применялся криогенный аппарат «Иней».

Лечение ККА проводили в 3 и 4 группах на 3, 5, 14-е сутки после моделирования гнойной раны. Криокислородное воздействие на рану осуществлялось с расстояния 1-2 см под давлением 0,1-0,3 МПа с экспозицией 1-2 с однократно.

Расчёт параметров дозировки криокислородного воздействия основывался на следующих принципах:

- при определении оптимального уровня давления и размера дисперсности подаваемого на раневые ткани криокислородного аэрозоля, главным критерием был визуальный контроль полноценности резорбции (впитывания) ККА в поражённые ткани: криокислородные аэрозольные частицы не должны скатываться с

раневого поверхности. Таким образом подобраны оптимальные параметры давления, дисперсности криокислородного аэрозоля и расстояния, с которого осуществлялось криовоздействие;

- экспозиция воздействия криокислородным аэрозолем определялась временем охлаждения тканей раневого поверхности до температуры -10 С, которая определялась дистанционным термометром с лазерным наведением.

Установленные параметры экспозиции и дозировки ККА воздействия не приводили к деструктивному эффекту и обуславливали наиболее высокий уровень повышения микроциркуляции после сеанса, оценённым методом лазерной доплеровской флоуметрии.

Лечение антибиотиком осуществляли в 2 и 3 группах в течение 5 суток после моделирования гнойной раны.

В контрольные этапы периода наблюдения животных подвергали декапитации, после чего осуществляли забор крови. Кровь центрифугировали в течение 15 минут при 250 g. Полученная плазма крови использовалась для определения активных форм кислорода, диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА), а также интерлейкина-2 (ИЛ-2) и интерлейкина-4 (ИЛ-4). Уровень ДК и МДА изучали и в эритроцитах, которые трехкратно промывали физиологическим раствором. Активность свободно-радикальных процессов в плазме крови изучали методом индуцированной биохемилюминесценции по показателю светосуммы (S) на приборе БХЛ-07 (Россия, г. Нижний Новгород).

Полученные цифровые данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента и коэффициента корреляции. Вычисления производили на CPU 1600 MHz "Intel Pentium-IV" с помощью пакета программ Microsoft Office 2013. Динамика показателей отражена на графиках, построенных с использованием программы электронных таблиц Microsoft Excel 2013.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования показали, что модель гнойной раны оказалась адекватной для решения поставленных цели и задач. Через 3-е суток после моделирования патологического процесса у всех экспериментальных животных произошло формирование ограниченного гнойно-деструктивного очага (абсцесса), скальпированный участок оставался «чистым», без визуальных признаков нагноения. Начальное морфологическое состояние раны животных всех исследованных групп было сопоставимо (рис. 1).



Рис. 1. Состояние скальпированной раны через трое суток после моделирования патологического процесса

Изучение состояния микроциркуляторного русла методом ЛДФ на аппарате «ЛАКК-М» показало, что наличие гнойно-деструктивного очага у подопытных животных сопровождалось нарушением микроциркуляции в области повреждения. Через трое суток K_V -показатель был достоверно ниже нормы во всех исследуемых группах: в первой группе – на 55,1 % ($p < 0,05$), во второй группе – на 49,0 % ($p < 0,05$), в третьей группе – на 47,5 % ($p < 0,05$), в четвертой группе – на 51,0 % ($p < 0,05$). Достоверных отличий показателей первых трех групп от контрольного выявлено не было. После проведения процедуры ККА регистрировали достоверное увеличение K_V -показателя в третьей и четвертой группах. Данный параметр в обеих группах был сопоставим с нормой и превышал таковой в контроле на 102,2 и 145,9 % ($p < 0,05$) соответственно для третьей и четвертой групп наблюдения.

Осмотр животных на 4-е сутки эксперимента через сутки после 1-го ККА лечения показал разницу состояния клинической картины у групп животных подвергавшихся и не подвергавшихся ККА воздействию (рис. 2).

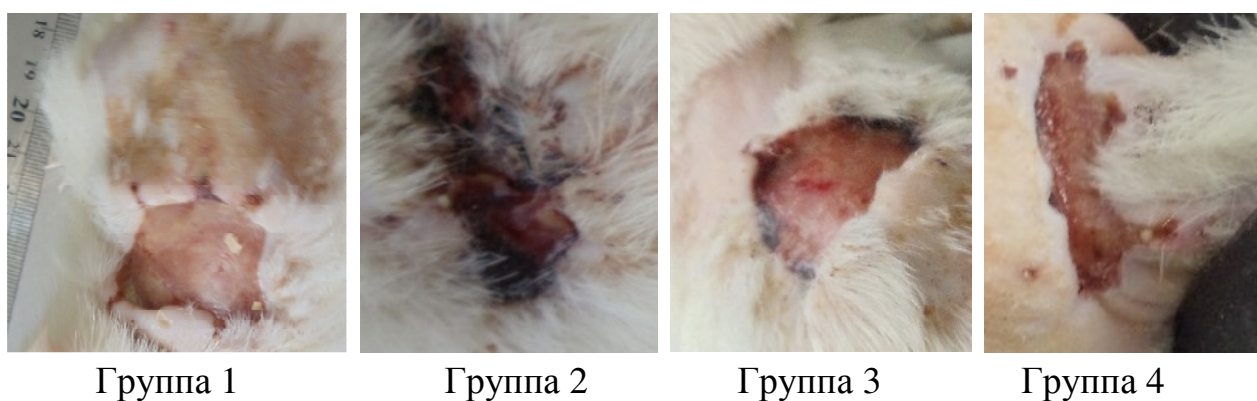


Рис. 2. Состояние раневой поверхности на четвертые сутки эксперимента

У животных 3 и 4 групп, получавших криокислородное лечение, в зоне скальпированной ране наблюдалось начало роста грануляций. В этот срок в зоне окружающей скальпированную рану в тканях становились менее выраженными отёчность и синюшность, а в области гнойного кармана (абсцесса) наблюдались процессы отграничения нагноения. Гнойных затеков у животных этих групп не наблюдалось, перифокальные ткани были уплотненными, общее состояние животных страдало в сравнительно меньшей степени. Они были менее апатичны и агрессивны, чем животные контрольной группы.

На 5-е сутки экспериментального исследования клинически различия развития гнойного процесса стали более выраженными. У животных 1 и 2-й происходило распространение гнойно-деструктивного процесса на скальпированный участок раны. В этот этап периода наблюдения наблюдались отёчность и пастозность кожи, прилегающей к ране (рис. 3).

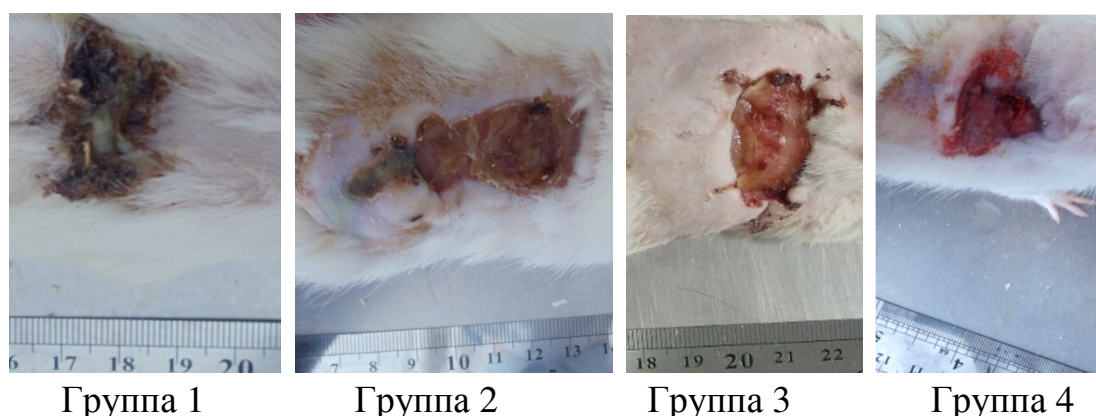
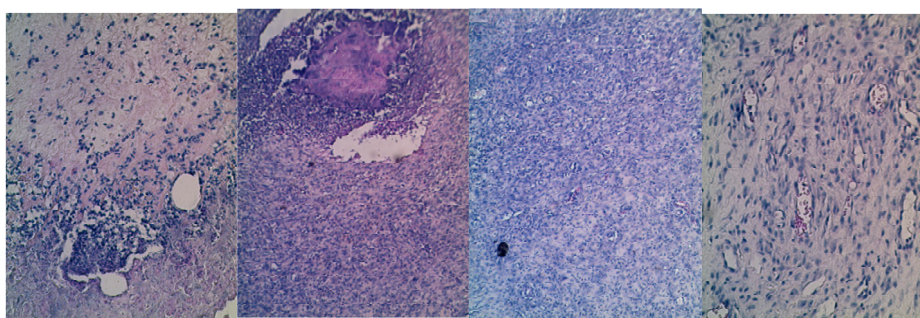


Рис. 3. Состояние раны животных на пятые сутки эксперимента

На 5-е сутки при микроскопическом исследовании во всех случаях в ране определялся некроз ткани, полнокровие и выраженная нейтрофильная инфильтрация различной степени интенсивности. В 3 и 4-й группах животных регистрировались явления образования грануляционной ткани (рис. 4).



Группа 1

Группа 2

Группа 3

Группа 4

Рис.4. Микроскопическая картина тканевых структур области раны на 5-е сутки исследования. Окраска гематоксилин-эозином. х 200

Исследование показателя микроциркуляции в ране на пятые сутки эксперимента показало, что K_V -показатель продолжал оставаться ниже нормы во всех исследуемых группах. После проведения процедуры ККА регистрировали достоверное увеличение K_V -показателя в третьей и четвертой группах. Данный параметр в обеих группах превышал таковой в контроле на 165,4 и 167,0 % ($p < 0,05$) соответственно.

На 5-е сутки эксперимента у животных 1–4 групп (по $n=3$) блоком иссечены ткани с гнойным очагом. При макровизуальной оценке выявлены достаточно выраженные морфологические различия препаратов у животных 3, 4 групп (проводилось криокислородное лечение) и 1, 2 групп (криокислородное лечение не проводилось).

Выявлены следующие различия:

- у животных второй группы в тканях, прилегающих к скальпированной ране, наблюдались отечность и синюшность, характерные для стаза крови в венозной части микроциркуляторного русла (венозное полнокровие); при заборе макропрепарата с участка скальпированной раны, подлежащих к раневой поверхности, ткани атрофичны, истончены, роста грануляционной ткани не наблюдалось;

- у животных третьей и четвертой групп в тканях, находящихся в непосредственной близости к скальпированной ране, не наблюдалось отечности и синюшности, кожа, прилегающая к ране была физиологической окраски, ее тургор не нарушен, подлежащие к раневой поверхности ткани плотные и по толщине сравнительно большие, чем в 1 и 2 группах;

- при заборе макропрепарата из области гнойного кармана у животных 1 и 2 групп наблюдалась имбибиция (пропитывание) окружающих тканей гнойно-

деструктивными массами, уплотнение перифокальных тканей (абсцедирование) не выражено;

- у животных 3 и 4 групп при заборе материала из области гнойного кармана наблюдалось уплотнение тканей, прилегающих гнойно-деструктивному процессу, визуально отмечалась картина отграничения нагноения (абсцедирования).

На 10-е сутки при микроскопическом исследовании в 2 группе незначительно снижаются площадь некроза и нейтрофильная инфильтрация ткани, полнокровие сосудов сохраняется. В 3 и 4 группах явления некроза, полнокровия и нейтрофильная инфильтрация тканей значительно уменьшились. Выявлены признаки продолжения формирования грануляционной ткани

На 14-е сутки эксперимента при проведении визуальной оценки морфологического состояния тканей выявлены более значительные различия в течении репаративного процесса гнойной раны (рис. 5).

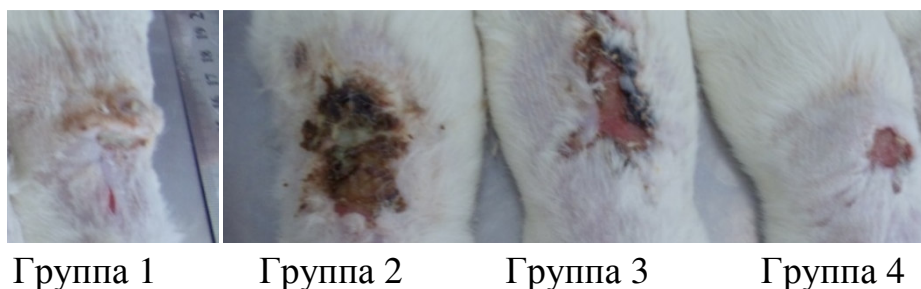


Рис. 5. Состояние раны животных на четырнадцатые сутки эксперимента

Наиболее выраженные морфологические изменения в этот срок отмечены у животных контрольной (первой) группы. Сами животные в этот этап периода наблюдения были вялыми, апатичными. При макроскопической оценке области раневой поверхности установлено, что ткани, прилегающие к «гнойному карману», были отёчны и напряжены, при надавливании на «гнойный карман» наблюдалось обильное выделение зловонных гнойно-деструктивных масс. Гнойный затек распространялся до вентральной области тела животного вплоть до передней стенки брюшной полости. Величина затёков была до 8 см. В verteбральной области нагноение распространилось на глубжележащие мышцы и фасции и тела с захватом тел позвонков.

У животных 2-й группы сохранялось распространение и даже прогрессирование гнойно-деструктивного процесса: ранее чистый участок скальпированной раны нагноился. В сторону каудальной части тела животного выявлялся гнойный затек, величиной до 3 см.

У подопытных животных третьей группы регистрировалось очищение раны от гнойно-деструктивных масс. В области скальпированной раны наблюдался рост грануляционной ткани, кожа, окружающая скальпированную рану, была неотечна физиологической окраски.

В 4-й группе экспериментальных животных раневая поверхность скальпированного участка была наименьшей, чем у животных остальных групп, в области «гнойного кармана» наблюдалось разрешение гнойно-деструктивного процесса, рана в этой области была чистой без наличия гнойных масс.

На 14-е сутки при гистологическом исследовании биопсийного материала в 3 и 4 группах в тканях области раны отмечается снижение до полного исчезновения явлений отёка, полнокровия и нейтрофильной инфильтрации. В этих же группах интенсивно формируются круглоклеточные элементы и грануляционная ткань. У животных 1 группы в этот срок еще в тканевых структурах гнойной раны еще регистрируются явления некроза, отёка, полнокровия сосудов, нейтрофильная инфильтрация. Однако появляются небольшие участки грануляционной ткани.

При исследовании в этот срок эксперимента микроциркуляции зарегистрированы следующие показатели. Показатель коэффициента вариации K_v , отражающий улучшение микроциркуляции после измерения методом лазерной доплеровской флоуметрии на 14 сутки эксперимента, так же давал лучшие средние показатели у животных групп 3 (ККА + а/б) и 4 (ККА), получавших криокислородное лечение групп как до проведения процедуры, так и после нее (данный параметр в обеих группах превышал таковой в контроле на 70,9–129,7 и 77,2–143,0 % ($p < 0,05$) соответственно для третьей и четвертой групп наблюдения).

На 22-е сутки (итоговые) эксперимента, при проведении визуального осмотра раневой поверхности в области моделированной гнойной раны и общего состояния животных было отмечено, что в зоне моделирования гнойного кармана у животных 1 группы длина раневой поверхности достигала 10 см. Отметим, что в каудальной области у животных наблюдалось развитие гнойно-деструктивного процесса. В моделированном кармане отмечалось спаивание кожи с мышцами спины

У животных 2 группы длина открытого раневого процесса достигает 11 см, наблюдалось отечность прилегающей кожи, выявлялись гнойные затеки, переходящие на вентральную часть области поясницы, диагностировано спаивание поясничных мышц и мышц бедра с тканями кожи. При аутопсии в препаратах, выделенных с участками мышечной ткани области затеков, подлежащие ткани имбибированы гнойными массами. Отметим, что общая длина раны с затеками была длиной до 12 см, шириной – 0,5-2 см.

У животных 3 группы, которым применена комбинированная терапия, длина раневой поверхности не превышала 5 см, при этом ширина составляла только 0,4-0,5 см. По всему участку открытой ткани наблюдался рост грануляционной ткани. В зоне скальпированного участка раны грануляции были более выражены, кожа вокруг раны не отекает. В области моделированного гнойного кармана наблюдались небольшие отекающие валики длиной 0,6-0,7 см, шириной – 0,4-0,5 см. Спаивание мышц и кожи не наблюдалось. В тканях по краю кожи, прилегающий к скальпированному участку раны, отека не было, гиперемия отсутствовала.

Весьма интересные результаты получены у животных 4 группы, которым проводилась ККА. Оказалось, что длина раневой поверхности не превышала 4 см, ширина – 0,5-0,6 см. В тканях, прилегающих к ране, отека не наблюдалось. Раневая поверхность была покрыта грануляциями. В области моделированного гнойного кармана отмечалось разрешение гнойного процесса и очищение раны от гнойно-деструктивных масс. При этом спаивание кожи с мышцами vertebralной зоны не было (рис. 6).

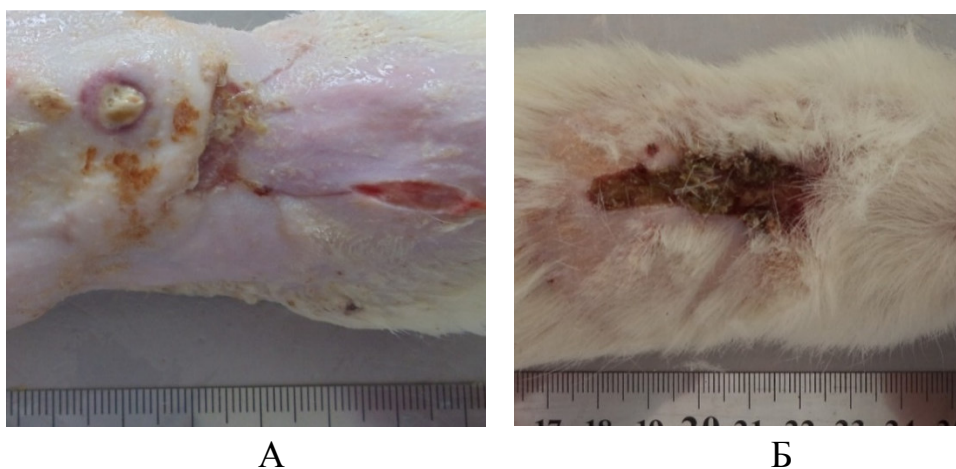


Рис. 6. Состояние раны на двадцать вторые сутки эксперимента (А – 1 группа (контрольная), Б – 4 группа)

Таким образом, анализ результатов экспериментальных исследований этого раздела позволяет выделить ряд положений:

- выбранная модель гнойной раны оказалась адекватной для решения поставленных задач. Гнойный процесс в области раны у животных контрольной группы (без лечения) прогрессировал и к 14-м суткам в области спины фактически сформировалась флегмона;

- гнойно-некротический процесс при выбранной модели сопровождался существенными нарушениями микроциркуляции. С патофизиологической точки

зрения одной из основных причин дисциркуляторных явлений выступает интоксикационный процесс;

- применение в лечении гнойного процесса только антибактериальной терапии не приводит к желаемому эффекту. К концу периода наблюдения гнойный процесс прогрессировал, а в области гнойной раны, также как и в контрольной группе, образовывалась флегмона;

- при использовании криокислородной терапии в лечении гнойной раны отмечен заметный положительный эффект. Причём наиболее высокая результативность лечения была при использовании ее без антибактериального компонента;

- доказано, что одним из возможных эффектов патогенетической криокислородной терапии является ее способность в значительной степени улучшать микроциркуляцию. Однако только улучшением трофики тканей области раны нельзя объяснить такую высокую эффективность разработанного способа терапии в лечении гнойного процесса такой выраженности. Поэтому на следующем этапе перед нами стояла задача установить другие возможные патогенетические механизмы действия криокислородной терапии.

Для определения антибактериального эффекта криокислородного лечения в динамике изучали уровень микробной обсемененности кожной раны *S. aureus*.

Исследованиями установлено, что через 10 мин после обработки раны криокислородным аэрозолем отмечено существенное снижение концентрации живых *S. aureus* в очаге воспаления: в 4,1 раза в 3 группе и в 6,7 раз – в 4 группе.. Через сутки после первого применения ККА (2-й день исследования) в экспериментальных 3 и 4 группах концентрация бактерий в ране была гораздо ниже, чем в 1 и 2 группах. Концентрация *S. aureus* в ранах уменьшилась в 4 группе в 9,1 раз, а в 3 группе – в 9,9 раза, по сравнению с исходным уровнем бактерий в очагах воспаления.

Повторное (второе) применение ККА через двое суток (5-й день эксперимента) способствовало быстрому уменьшению концентрации бактерий в гнойной ране у экспериментальных животных. При этом снижение микробной обсемененности раны через сутки после обработки ККА (6-й день эксперимента) было более выраженным в 3 группе, где применялась сочетанная терапия «ККА + антибиотик» концентрации *S. aureus* в ранах уменьшилась в 92,5 раз по сравнению с исходным уровнем.

Существенное снижение контаминации раны наблюдалось в тот же период времени и у животных 2 группы (в 3,5 раза на 2-й день и в 11,8 раза на 4-й день микробиологического исследования), но здесь бактерицидный эффект был менее выражен, чем в группах животных, где использовали ККА. У нелеченых животных также отмечали двукратное снижение концентрации бактерий в ране (по-

видимому, за счет активации факторов естественной резистентности). Однако в дальнейшем на 8-е сутки исследования у них все еще отмечалась достаточно высокая концентрация *S. aureus* в очаге воспаления.

Третья обработка ККА в экспериментальных группах проводилась через восемь суток после второй обработки (14-й день эксперимента). Микробиологическое исследование содержимого раны, проведенное на следующий - 15-й день эксперимента, показало, что в зоне повреждения все еще присутствует *S. aureus*. Кроме того, наблюдалось даже некоторое повышение концентрации золотистого стафилококка в ранах. Данный эффект был, по всей видимости, связан со слишком большим периодом «терапевтического окна» (восемь суток), во время которого микробная популяция смогла частично восстановиться. Таким образом, увеличение периода «терапевтического окна» (без лечения) более чем на двое суток снижает степень эффективности ККА по очищению раны от бактерий.

Изучение механизма подавления роста и размножения бактерий в ране на фоне ККА-воздействия проведено эксперименты в опытах *in vitro*.

Результаты показали, что обработка криокислородным аэрозолем культуры стафилококков, засеянной на агаре, не влияла на рост и размножение испытуемых (факультативно-анаэробных) микроорганизмов.

Данный результат вполне укладывается в общую концепцию метаболизма бактерий, поскольку известно, что наличие кислорода в окружающей среде может оказывать существенный ингибирующий эффект лишь в отношении строгих анаэробов, таких как *Clostridium spp.* и др. Таким образом, был сделан вывод о том, что ККА-воздействие не обладает прямым бактерицидным эффектом в отношении бактерий-аэробов и факультативных анаэробов.

Оценка интенсивности окислительных процессов по показателям хемилюминесценции показала, что после второй обработки гнойной раны в плазме крови экспериментальных животных установлено многократное увеличение активности процесса СРО во всех опытных группах относительно нормы (интактной группы). При этом исследованные показатели этих групп существенно не отличались между собой. Третья обработка криокислородом вызывала снижение интенсивности СРО относительно предыдущего измерения. Однако наиболее высокие значения сохранялись во 2 группе с применением антибиотика, а 3 группа оказалась наиболее близка к интактным значениям данного показателя (рис. 7).

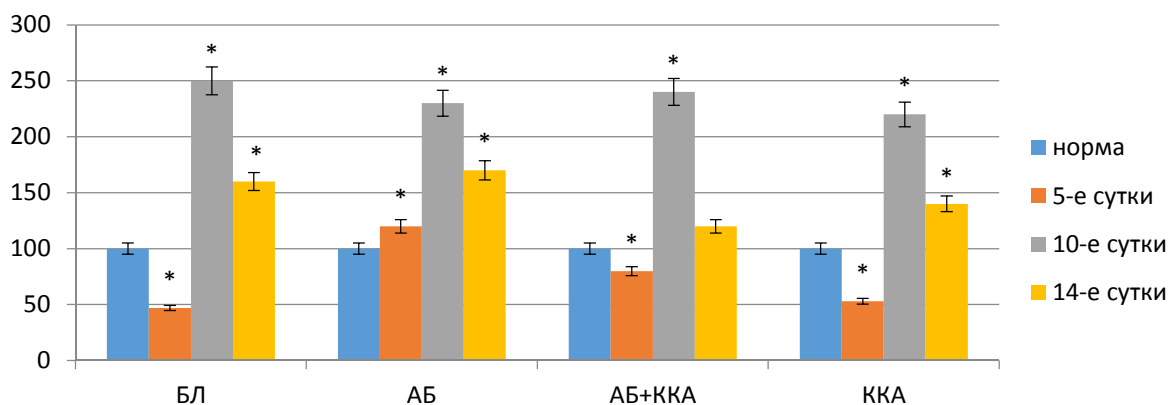


Рис. 7. Интенсивность свободно-радикальных реакций липопероксидации по показателям хемилюминесценции (* – достоверность относительно нормы при $p < 0,05$)

Таким образом, наиболее мягким воздействием на систему СРО, выражающемся в плавном росте и постепенном снижении активности процессов окисления обладает комплексная терапия, сочетающая фармакологическое и криокислородное воздействие.

Биохимическое исследование активности процессов липопероксидации выявило достоверное увеличение уровня первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов в плазме крови после первой обработки криокислородом у животных в группах 1 (БЛ) и 4 (ККА) относительно, интактных животных. Причем в группе 4, после применения ККА данный показатель статистически значимо выше значений группы 1 (БЛ), что объясняется формированием активных форм кислорода, являющихся стимулятором ПОЛ под воздействием ККА. (рис. 8).

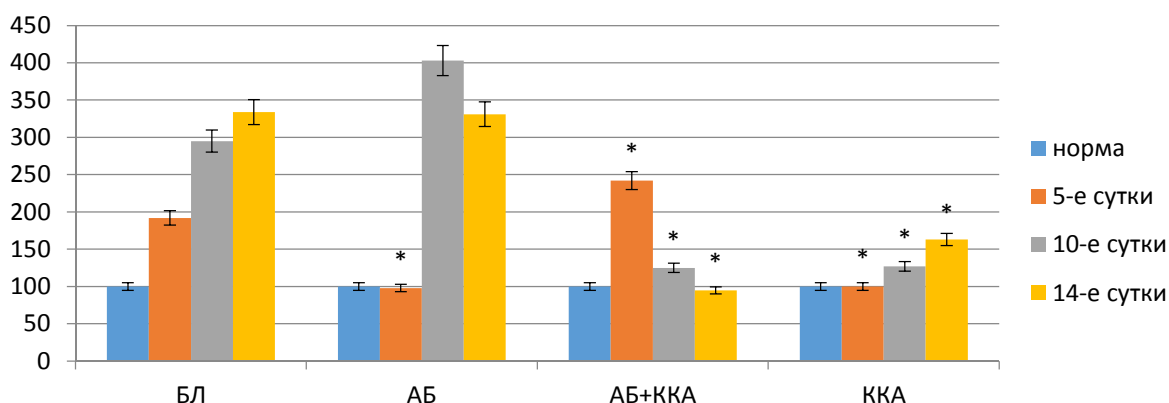


Рис. 8. Содержание диеновых конъюгатов в плазме крови в динамике эксперимента (* – достоверность относительно контроля при $p < 0,05$)

Схожие изменения выявлены по уровню ДК и в мембранах эритроцитов. Многократное увеличение их количества выявлено после первой обработки раны в группах 1(БЛ) и 4 (ККА) относительно уровня интактной группы.

Изучение уровня малонового диальдегида в плазме крови и эритроцитах показало, что после повторного воздействия криокислородным аэрозолем динамика уровня МДА в плазме и мембранах эритроцитов в опытных группах была направлена в сторону снижения по сравнению с предшествующим сроком измерения.

На следующем этапе работы была проведена оценка иммунного статуса экспериментальных животных при сформированном гнойно-воспалительном процессе по уровню интерлейкинов.

При исследовании плазмы крови у экспериментальных животных отмечалось достоверное снижение уровня ИЛ-2 во всех экспериментальных группах по сравнению с контролем на 3-и сутки после формирования гнойно-воспалительного процесса. Наиболее низкая концентрация отмечались в группе 1 (не леченые). По мере прогрессирования бактериальной инфекции уровень ИЛ-2 в крови снижается (табл.1).

На 10-е сутки после начала лечения отрицательная динамика по уровню ИЛ-2 сохранялась, но минимальны значения фиксировались в группах с применением криокислорода как по сравнению с интактными животными, так и контрольными значениями (группа 1). Однако на 14 сутки после начала лечения обнаружилось разнонаправленный эффект на содержание ИЛ-2 на различные виды терапии. В группе 1 и 2 уровень цитокина продолжает опускаться, что говорит о сохранении бактериальной инфекции. Группа 3 и 4 характеризовались резким увеличением данного показателя по сравнению с контрольной группой.

При регистрации продукции ИЛ-4 обращали на себя внимание низкий уровень базовой секреции, видимо связанный с особенностью применяемого набора. Однако при изучении уровня ИЛ-4, как основного противовоспалительного цитокина, обнаружен статистически достоверный рост его содержания на 14 сутки после лечения по сравнению с контрольными пробами для групп с применением криокислородного лечения.

Таблица 1

Содержание ИЛ в сыворотке крови крыс при гнойно-воспалительном процессе (M±m)

	ИЛ-2, пг/мл	ИЛ-4 пг/мл
Интактные (n=15)	65,51±2,2	0
5-е сутки		

Группа 1 (n=5)	27,17±4,2*	0
Группа 2 (n=6)	41,34±4,6* ^	0
Группа 3 (n=6)	39,33±4,0* ^	0
Группа 4 (n=6)	47,37±5,8* ^	0
10-е сутки		
Группа 1 (n=5)	27,37±6,2*	0
Группа 2 (n=6)	26,20±3,2*	0
Группа 3 (n=6)	13,88±1,8* ^	0
Группа 4 (n=6)	9,76±1,2* ^	0
14-е сутки		
Группа 1 (n=5)	23,6±2,6*	0
Группа 2 (n=6)	14,9±1,7* ^	0
Группа 3 (n=6)	45,6±4,8* ^	2,4±0,3*
Группа 4 (n=6)	45,8±6,1* ^	3,5±0,4*

* - достоверность по отношению к интактной группе при $p<0,05$; ^ - достоверность по отношению к контрольной группе при $p<0,05$.

Результаты проведенного экспериментального исследования показывают, что применение криокислородной терапии в лечении гнойно-воспалительного процесса отдельно или в комбинации с антибактериальной терапией приводит к заметному клиническому положительному эффекту. Безусловно, главным результирующим действием нового способа терапии при выбранной экспериментальной модели является его способность ограничивать распространение гнойного процесса: в начале терапии происходило отчетливое ограничение воспалительного очага, а к 22-м суткам эксперимента – явления гнойного воспаления купировались. Как показали наши исследования, результативность криокислородной терапии в лечении гнойно-воспалительного процесса мягких тканей была обусловлена рядом положительных эффектов:

- высокой бактерицидной способностью терапии в гнойно-воспалительном очаге: после проведения первого сеанса отмечается уменьшение количества микроорганизмов в ране в 9,1 раз, после второго – в 36,7 раз;

- существенным уменьшением проявлений системной воспалительной реакции за счет иммуномодулирующего эффекта: на фоне криокислородной терапии отмечается стабилизация уровня провоспалительного ИЛ-2 и достоверное увеличение противовоспалительного цитокина ИЛ-4;

- способностью уменьшать дисциркуляторные явления на микроциркуляторном уровне: отчетливое положительное действие терапии проявляется после каждого сеанса воздействия;

- мембраностабилизирующей способностью за счёт ингибирования процесса перекисного окисления липидов.

Благодаря такому широкому спектру положительных действий криокислородной терапии происходит не только быстрое «очищение» гнойной раны, но и повышается их репаративный потенциал, что вкупе и приводит к значительному лечебному эффекту.

Таким образом, полученные результаты экспериментальных исследований с использованием различных лабораторно-инструментальных методов оценки расстройств гомеостаза на местном и организменном уровнях не только позволяет установить высокую результативность криокислородной терапии, но и установить ряд патогенетических ее эффектов, что в целом подводит фундаментальную базу для апробации и применения этого нового способа лечения в клинике.

ВЫВОДЫ

1. При выбранной модели в контрольной группе животных гнойно-воспалительный процесс мягких тканей области спины прогрессировал и к 14-м суткам трансформировался во флегмону. На организменном уровне эти патологические явления сопровождались выраженными нарушениями микроциркуляции (Кv-показатель ниже нормы на 53,6 %), резкой активизацией свободно-радикального процесса (увеличение на 56,1 %), угнетением иммунитета (уровень IL-2 снижался на 64,0 %).

2. Применение антибактериальной терапии в лечении гнойной раны мягких тканей области спины не приводит к заметному положительному эффекту: гнойно-воспалительный процесс при макро-микроскопической оценке также как и в контроле прогрессирует вплоть до образования флегмоны мягких тканей с яркими проявлениями системной воспалительной реакции.

3. При использовании криокислородной терапии в лечении гнойной раны отмечен заметный положительный эффект. В начале терапии происходило ограничение воспалительного очага, а к 22-м суткам эксперимента явления гнойного воспаления купировались, отмечалась активная регенерация тканевых структур. Включение антибактериального компонента повышает эффективность криокислородной терапии.

4. Локальное криокислородное воздействие на область гнойной раны приводит к выраженному снижению бактериальной обсеменённости раны (снижение КОЕ относительно контроля на 94,0 %) и сопровождается существенным уменьшением проявлений системной воспалительной реакции (стабилизации уровня провоспалительного IL-2 и появления противовоспалительного цитокина IL-4).

5. Применение криокислородной терапии в лечении гнойной раны приводит к существенному улучшению микроциркуляции (Kv-показатель выше контрольного на 167,0 %), значительному уменьшению выраженности свободно-радикальных реакций процесса перекисного окисления липидов (интенсивность свободнорадикальных реакций снижалась относительно контроля на 22,9 %, содержание диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в плазме крови уменьшалось относительно контроля на 51,0-71,6 %).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Установленный выраженный положительный патогенетический эффект криокислородной терапии в лечении гнойной раны является основанием для рекомендации этого нового способа лечения и клинической апробации у больных с гнойно-воспалительными процессами мягких тканей. Универсальность модулируемых криокислородной терапией патогенетических эффектов в отношении инфекционного агента позволяет провести клиническую апробацию способа у больных с самым широким спектром хирургических инфекций.

Полученный потенцирующий эффект сочетанной криокислородной и антибактериальной терапии позволяет рекомендовать проведение исследований для разработки новых схем комбинированного лечения различных гнойных заболеваний.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗБОТКИ ТЕМЫ

Полученный репаративный эффект при применении криокислородной терапии позволяет предположить его успешное применение в лечении не только гнойных, но и «чистых» ран при самом широком спектре хирургических патологий.

С этой целью требуются дополнительные фундаментальные исследования, доказывающие патогенетическую направленность и эффективность такого рода терапии.

Применённый в диссертационном исследовании оригинальный аппарат прошёл регистрацию в Росздравнадзоре и разрешён к применению на территории РФ, данный факт позволяет, предположить скорейшее внедрение в широкую клиническую практику, новой отечественной инновационной медицинской криокислородной технологии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Исследования воздушной криоконденсации/ Григорьев А.Г., Хозяйкин В.В., Коченов В.И., Цыбусов С.Н., Кулакова К.В., Щербатюк Т.Г., Гордеев А.С., Зимина С.В. // Криотерапия в России: материалы 1 международной науч.-практ.конф. – СПб, 2008. – С.118-119.

2. Экспериментальное исследование ранних критериев прогноза линии крионекроза внутри тканей после криодеструкции кожи и перевивных опухолей у животных/ Темнова И.В., Артифексова А.А., Цыбусова Т.Н., Коченов В.И., Цыбусов С.Н., Буланов Г.А., Григорьев А.Г., Андрияшин Е.В., Ермакова Е.А. // Опухоли кожи и мягких тканей: материалы Всемирной науч.-практ.конф. – СПб, 2009. – С. 108-111.

3. Выбор метода криодеструкции в зависимости от варианта патологического очага при атеромах кожи/ Ерошевский В.В., Коченов В.И., Цыбусов С.Н., Буланов Г.А., Григорьев А.Г., Ермакова Е.А. // Медицинская криология: сб. науч. тр. – Н. Новгород, 2009. – Вып.7. – С.104-108.

4. Рассечение замороженной ткани радиоволновым скальпелем в криохирургии/ Ермакова Е.А., Коченов В.И., Цыбусов С.Н., Буланов Г.А., Артифексова А.А., Козьякин В.В., Ходаковский Ю.П., Григорьев А.Г., Ерошевский В.В., Темнова И.В., Анесолян О.М. // Медицинская криология: сб. науч. тр. – Н. Новгород, 2009. – Вып. 7. – С.101-107.

5. Кριοкислородная методика в лечении гнойных ран и трофических язв// Григорьев А.Г., Мартынов В.Л. // Сборник тезисов ФГБУ «Институт им. А.В. Вишневого» Минздрава РФ. – М., 2014. – С.82-83.

6. Бактерицидный эффект применения кριοкислородного метода при лечении гнойно-деструктивной раны/ Григорьев А.Г., Шевантаева О.Н., Заславская М.И. // Медицинский альманах. 2014. № 5 (35) -С. 182-184.

7. Морфологические особенности заживления гнойных ран при использовании кριοкислородного метода/ Григорьев А.Г., Григорьева А.А., Орлинская Н.Ю., Шевантаева О.Н., Щелчкова Н.А., Миронов А.А. // Морфологические ведомости. 2015. № 1. Т. 23 -С.-37-42.

8. Иммуновоспалительные реакции при гнойных ранах в процессе комбинированного лечения // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2; URL: <http://www.science-education.ru/131-23417> (дата обращения: 01.12.2015). Григорьев А.Г., Власов А.П., Григорьева А.А., Щелчкова Н.А., Орлинская Н.Ю., Болотских В.А., Шевалев Г.А.

9. Интенсивность липопероксидации при гнойно-воспалительных процессах в динамике комбинированной терапии // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2; URL: <http://www.science-education.ru/131-23620> (дата обращения: 02.12.2015). Григорьев А.Г., Власов А.П., Григорьева А.А., Щелчкова Н.А., Болотских В.А., Шевалев Г.А.

Патент

1. Григорьев А.Г. Кримогенный аппарат. Патент на полезную модель № 114837 от 20.04.2012 г. Опубликовано: 20.04.2012 г. Бюл. № 11.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДК – диеновые конъюгаты;
IL-2 – интерлейкин 2;
IL-4 – интерлейкин 4;
ККА – криокислородный аэрозоль;
МДА – малоновый диальдегид;
ПОЛ – перекисное окисление липидов;
СРО – свободнорадикальное окисление.
МПА – мясо-пептонный агар

РЕЗЮМЕ

**кандидатской диссертации А.Г. Григорьева
«Патогенетическое обоснование криокислородной терапии при
гнойно-воспалительном процессе, вызванном госпитальным
полиантибиотико-резистентным штаммом золотистого стафилококка»**

В представленном диссертационном исследовании было проведено изучение эффективности и механизмов действия нового способа лечения – криокислородной терапии. Объектом исследования являлись крысы, которым моделировали гнойно-воспалительный процесс мягких тканей. Изучались эффекты воздействия на локальном и организменном уровнях. Впервые установлено, что применение криокислородной терапии на начальных этапах приводит к ограничению воспалительного очага, а затем к его купированию с выраженными явлениями регенерации тканевых структур. Доказано, что в основе высокой антибактериальной эффективности криокислородного воздействия при лечении гнойной раны лежит не прямое бактерицидное действие, за счёт иммуномодулирующей способности. Выявлено, что одним из механизмов криокислородного воздействия в индукции репаративного потенциала регенерирующих структур гнойной раны является его способность улучшать микроциркуляцию и снижать мембранодестабилизирующие явления за счёт ингибирования процессов перекисного окисления липидов.

SUMMARY

of A.G. Grigoriev`s PhD dissertation “Pathogenetic justification the cryooxygen therapy in pyogenic inflammatory process which caused by nosocomial multiantibiotic-resistant strain of Staphylococcus aureus”.

It was conducted the study of effectiveness and mechanisms of action of a new method of treatment – “cryooxygen therapy” during scientific research. The objects of the research were rats with modeled pyogenic inflammatory process of the soft tissues. It was studied the local and systemic effects. It was first founded the cryooxygen therapy results to inflammatory focus limitation at the early stages and further disappearance of the inflammation and manifest regeneration of the tissue structures. It was proved that the base of high antibacterial effect of cryooxygen therapy in the treatment of a purulent wound was an immunostimulating capacity.

It was revealed that one of the mechanisms of the cryooxygen influence at the induction of a reparative potential of the purulent wound regenerating structures was its ability to improve microcirculation and reduce membrane destabilization due to the inhibition of a lipid peroxidation.